(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2001年5月3日 (03.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/31038 A1

(51) 国際特許分類7: C12N 15/62, 1/21, 9/80, 11/12, C07K 17/12, 19/00, C12P 17/18, 21/02 // (C12N 9/80, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 9/80, C12R 1:465) (C12P 21/02, C12R 1:465)

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07275

(22) 国際出願日: 2000年10月19日 (19.10.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/301699 1999年10月22日 (22.10.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田中渥夫 (TANAKA, Atsuo) [JP/JP]; 〒619-0224 京都府相楽郡木津町兜台7丁目9番地7 Kyoto (JP). 植田充美 (UEDA, Mitsuyoshi) [JP/JP]; 〒665-0033 兵庫県宝塚市伊子志3丁目2-47 Hyogo (JP). 長尾康次 (NAGAO, Koji) [JP/JP]; 〒490-1111 愛知県海部郡甚目寺町甚目寺西大門130-2-202 Aichi (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

[続葉有]

(54) Title: GENETIC ENGINEERING IMMOBILIZATION OF HETEROMER PEPTIDES

(54) 発明の名称: ヘテロマーペプチドの遺伝子工学的固定化

(57) Abstract: A method of immobilizing heteromer peptides having a plural number of subunits, which are formed by cutting off precursor peptides, on a chitin or cellulose carrier by expressing a protein carrying a chitin-cellulose binding domain (CBD) fused therewith by using a genetic engineering technique. Heteromer peptides having a chitin-cellulose binding domain fused therewith; and a method of immobilizing these heteromer peptides. These heteromer peptides having a chitin-cellulose binding domain are useful in techniques for immobilizing catalytic enzymes for producing useful substances, etc. The method of immobilizing heteromer peptides is applicable to industrial uses.

(57) 要約:

遺伝子組換え技術を用いてキチン・セルロース結合ドメイン (CBD) を融合させた蛋白質を発現させることで、前駆体ペプチドの切断により生成される、複数のサブユニットを持つヘテロマーペプチドをキチンまたはセルロース担体に固定化する方法を開発した。本発明は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたヘテロマーペプチド、および該ヘテロマーペプチドを固定化する方法を提供する。キチン・セルロース結合ドメインを持つヘテロマーペプチドは、有用物質を生成するための触媒酵素などの固定化技術として有用である。本発明の方法に基づくヘテロマーペプチドの固定化方法は、工業的な用途にも応用することができる。

WO 01/31038 A1

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

ヘテロマーペプチドの遺伝子工学的固定化

技術分野

本発明は、ヘテロマーペプチドの固定化に関する。具体的には、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたヘテロマーペプチド、および該ヘテロマーペプチドをキチン・セルロースに固定化する方法に関する。

背景技術

酵素を担体に固定化することは生物工学的に重要な意味を持っており、工業、研究、および臨床場面において、担体に固定化された様々な酵素が用いられている。酵素の固定化には、物理的に吸着させる方法や共有結合により結合させる方法などがある。例えば、遺伝子工学的に酵素を固定化するために、担体やある種の蛋白質に結合活性を有するペプチドを、目的の酵素に融合させる方法が用いられる場合がある。このようなペプチドの例としては、セルラーゼやキチナーゼなどの酵素中に存在するセルロースまたはキチンに特異的に吸着するアフィニティーペプチド(以後「セルロース・キチン結合ドメイン(cellulose or chitin binding domain; CBD)」という）が知られている。セルロースやキチンは安価で毒性がなく、また化学的に安定であるため、酵素を固定化するための担体として適している。また、膜状、粉末状、ビーズ状などの形態に加工することも容易である。実際、CBDを融合させた酵素蛋白質を、その活性を保ったまま固定化する技術が開発されている（E. Ong et al., 1991, Enzyme Microb. Technol. 13: 59-65)。また、セルロース・キチン結合ドメインは複数の生物の各種酵素から単離・同定されており、これらは種々の酵素の固定化に利用できることが示されている（例えばP. Tomme et al., 1996, Ann. N. Y. Acad. Sci. 799: 418-424参照)。しかし、これ

までCBDを用いた固定化が試みられてきた酵素はいずれも単体で働くモノメリックな酵素であり、サブユニット構造を持つ酵素を、CBDを用いて固定化した例は存在しない。

複数のサブユニットから構成されるヘテロマーからなる酵素は、工業的にも重要なものが多い。例えばこのような酵素としては、αおよびβサブユニットから構成されるヘテロマー蛋白質である7-β-(4-カルボキシブタンアミド)-セファロスポラン酸アシラーゼ（「GL-7ACAアシラーゼ」と略す）が挙げられる。7-アミノセファロスポラン酸（7-ACA）は、セファロ系抗生物質の重要中間体であり、微生物により生産されるセファロスポラン酸（CC）を出発材料として、化学合成、あるいは酵素反応の技術を利用して、工業的に合成、産生されている。GL-7ACAアシラーゼは、CCから7-ACAの酵素合成法の中間体であるグルタリル-7-ACAを基質として、脱アミノアシル反応を触媒し、7ACAを産生する工程に利用される。従って、この酵素を、活性を保ったまま簡便に固定化する技術を開発することは、工業的利用の観点から高い有用性を持っている。GL-7ACAアシラーゼは、ペニシリンアシラーゼ、他のセファロスポラン酸アシラーゼなどと同様にヘテロマーペプチドからなる酵素であり、酵素遺伝子の発現により前駆体ペプチドが合成された後に、特異的なプロセッシング機構によりペプチドが切断されて多量体となることが知られている。このような酵素は、サブユニットの一方のみを固定したのでは、活性を発現することができないと考えられていた。あるいは、たとえ一方のサブユニットを固定し、他方のサブユニットをこれに結合させることによって固定化したとしても、工業的な用途に耐えうる安定性は期待できない恐れがあった。

発明の開示

本発明は、キチン・セルロース結合ドメイン（CBD）を融合させたヘテロマーペプチドおよびその利用を提供することを課題とする。また本発明は、該ヘテロマーペプチドの製造方法および該ヘテロマーペプチドを固定化する方法等を提供す

ることを課題とする。

本発明者らは、GL-7ACAアシラーゼを例として、遺伝子工学的な手法を応用したヘテロマーペプチドの固定化を目指し、鋭意研究を重ねた。具体的には、GL-7ACAアシラーゼ遺伝子に、セルロース・キチン結合ドメイン(CBD)を融合させ、大腸菌を宿主としてこの遺伝子を発現させ、CBDの働きによりキチンビーズにGL-7ACAアシラーゼを固定化した。本発明において、GL-7ACAアシラーゼの３つの異なる部位にCBDを遺伝子工学的に融合させた遺伝子を作製し、それらの発現を試みたところ、すべての融合遺伝子について、キチンへの特異的な吸着と吸着状態での活性の発現に成功した。本発明のヘテロマーペプチドの作製は、環状リポペプチドのアシル化を媒介する環状リポペプチドアシラーゼを含む他の様々なアシラーゼ等にも適用することが可能である　。これらの事実に基づき本発明者らは、キチン・セルロース結合ドメインを有する前駆体ペプチドを調製することにより、活性を保持したままキチンまたはセルロースに固定化が可能なヘテロマーペプチドを製造することが可能であることを見出し本発明を完成させた。

すなわち本発明は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたヘテロマーペプチド、該ヘテロマーペプチドの製造方法、該ヘテロマーペプチドを固定化する方法、および該ヘテロマーペプチドの利用等を提供するものであり、より具体的には、

〔１〕前駆体ペプチドの切断により生成されるヘテロマーペプチドを構成するサブユニットの少なくとも１つがキチン・セルロース結合ドメインを付加されているヘテロマーペプチド、

〔２〕ヘテロマーペプチドが自己スプライシングによって生成される蛋白質である、〔１〕に記載のペプチド、

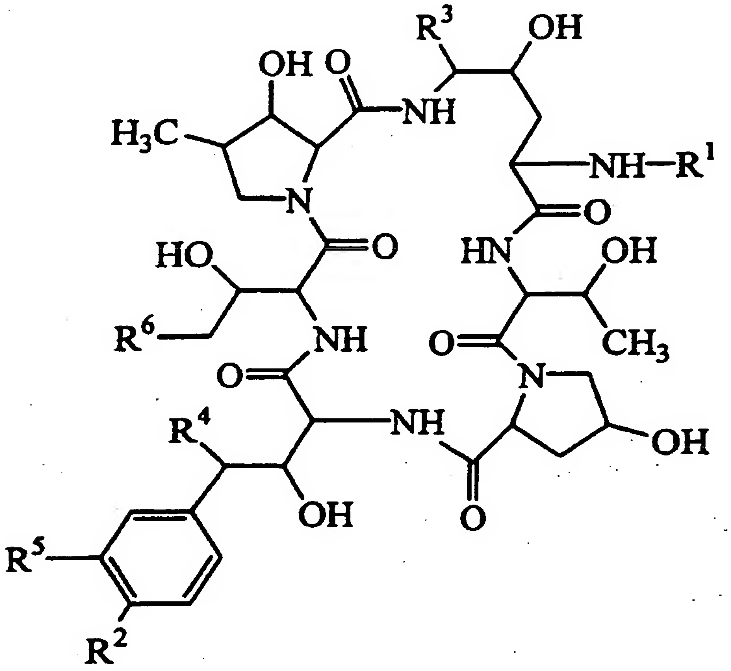
〔３〕自己スプライシングによって生成される蛋白質がアミノアシラーゼである、〔２〕に記載のペプチド、

〔４〕アミノアシラーゼが７－β－（４－カルボキシブタンアミド）－セファ

ロスポラン酸アシラーゼである、〔3〕に記載のペプチド、

〔5〕自己スプライシングによって生成される蛋白質が環状リポペプチドアシラーゼである、〔2〕に記載のペプチド、

〔6〕環状リポペプチドアシラーゼが式：



(IV)

（式中 R^1 はアシル基、R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、R^3 は水素またはヒドロキシ基、R^4 は水素またはヒドロキシ基、R^5 は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および R^6 は水素またはカルバモイル基を意味する）で示される化合物IVのアシル化を触媒するアシラーゼである、〔5〕に記載のペプチド、

〔7〕〔1〕に記載のヘテロマーペプチドの前駆体ペプチド、

〔8〕前駆体ペプチドが、以下の（a）、（b）、または（c）のいずれかのペプチドである〔7〕に記載の前駆体ペプチド、

（a）配列番号：１７、配列番号：１９、配列番号：２１、および配列番号：２８に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド

（b）配列番号：１７、配列番号：１９、配列番号：２１、および配列番号：２

BNSDOCID: <WO___0131038A1_I_>

８に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつキチンまたはセルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド

（ｃ）配列番号：１６、配列番号：１８、配列番号：２０、および配列番号：２７に記載の塩基配列からなる群から選択されるいずれかの塩基配列を有するＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるＤＮＡによってコードされ、かつキチン・セルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド

〔９〕〔８〕に記載の前駆体ペプチドをコードするＤＮＡ、

〔１０〕〔９〕に記載のＤＮＡを含む発現ベクター、

〔１１〕〔１０〕に記載の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞、

〔１２〕〔１１〕に記載の宿主細胞を培地で培養し、宿主細胞および／またはその培養上清からヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを回収することを特徴とする、〔１〕に記載のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドの製造方法、

〔１３〕〔１〕に記載のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを、キチンおよび／またはセルロースに接触させる工程を含む、固定化ヘテロマーペプチドの製造方法、

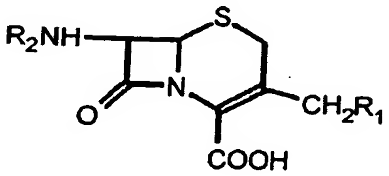
〔１４〕〔１〕に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチド、

〔１５〕（ａ）〔１４〕に記載の固定化ヘテロマーペプチドに、該ヘテロマーペプチドの基質を接触させる工程、および

（ｂ）工程（ａ）における反応生成物を回収する工程、を含む、固定化ヘテロマーペプチドに触媒されて生じる反応生成物の製造方法、

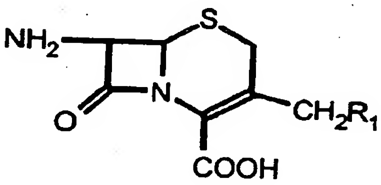
〔１６〕〔４〕に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドに、

式：



(II)

（式中、R_1はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素、R_2は炭素数３～８のカルボキシアルカノイルまたはＤ－グルタミルを示す）で示される化合物（II）またはその塩を接触させて、式：

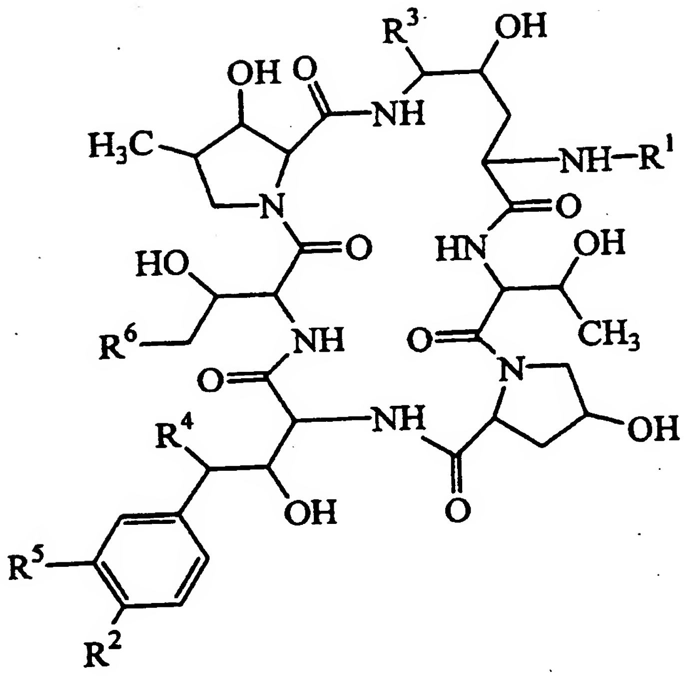


(I)

（式中、R_1はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素を示す）で示される化合物（Ｉ）またはその塩を得ることを特徴とする化合物（I）の製造法、

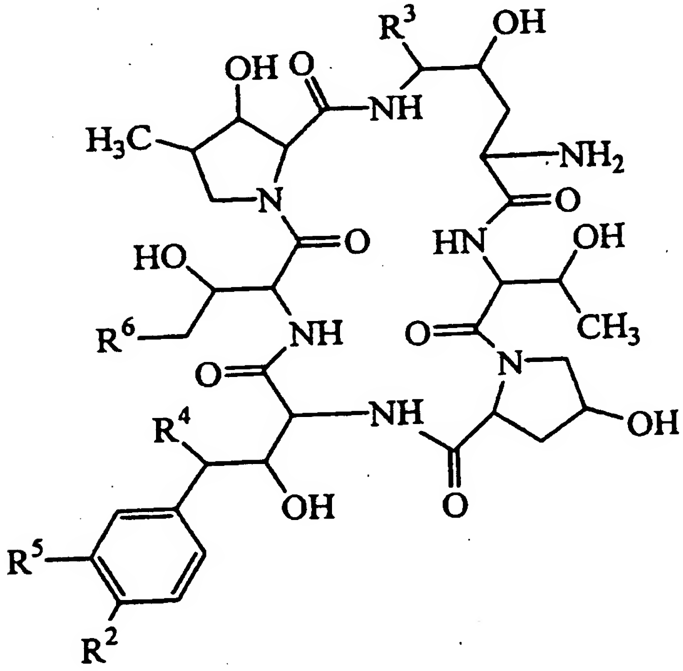
〔１７〕〔６〕に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドに、

式：



(IV)

（式中 R^1 はアシル基、R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、R^3 は水素またはヒドロキシ基、R^4 は水素またはヒドロキシ基、R^5 は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および R^6 は水素またはカルバモイル基を意味する）で示される化合物（IV）またはその塩を接触させて、式：

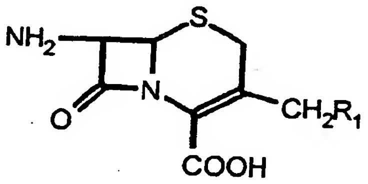


(III)

（式中、R^2、R^3、R^4、R^5 および R^6 は前記と同じ基を意味する）で示される化合物（III）またはその塩を得ることを特徴とする化合物（III）の製造法、

〔18〕７－β－（４－カルボキシブタンアミド）－セファロスポラン酸アシラーゼを構成するサブユニットの少なくとも１つにキチン・セルロース結合ドメインを付加し、該キチン・セルロース結合ドメインをキチンおよび／またはセルロースに固定化してなる、

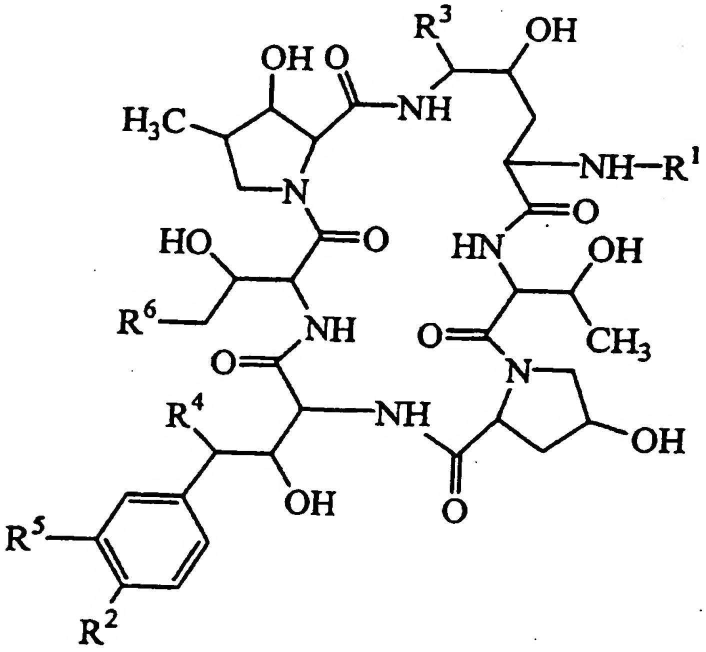
式：



(I)

（式中、R_1 はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素を示す）で示される化合物（Ｉ）製造用の固定化酵素、

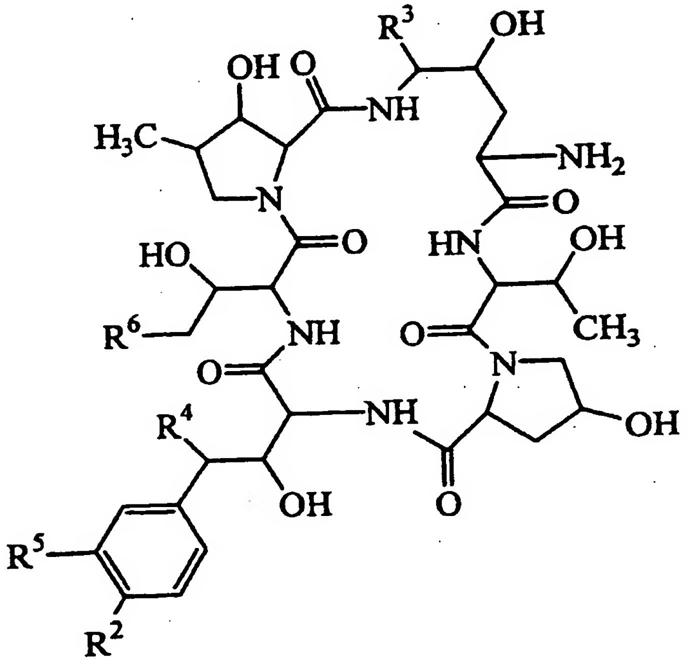
〔19〕式：



(IV)

（式中 R^1 はアシル基、R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、R^3 は水素また

はヒドロキシ基、R^4 は水素またはヒドロキシ基、R^5 は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および R^6 は水素またはカルバモイル基を意味する）で示される化合物（IV）またはその塩のアシル化を触媒する環状リポペプチドアシラーゼを構成するサブユニットの少なくとも１つにキチン・セルロース結合ドメインを付加し、該キチン・セルロース結合ドメインをキチンおよび／またはセルロースに固定化してなる、式：



(III)

（式中、R^2、R^3、R^4、R^5 および R^6 は前記と同じ基を意味する）で示される化合物（III）製造用の固定化酵素、に関するものである。

本発明は、前駆体ペプチドの切断により生成されるヘテロマーペプチドを構成するサブユニットの少なくとも１つがキチン・セルロース結合ドメインを付加されているヘテロマーペプチドに関する。本発明におけるヘテロマーペプチドとは、該ヘテロマーペプチドをコードする遺伝子の転写および翻訳により、まず一本鎖の前駆体ペプチドが合成された後、該前駆体ペプチドがプロセッシングにより切断を受けて生成する、２つ以上のサブユニットからなるヘテロマーペプチドであって、該ヘテロマーペプチドを構成するサブユニットの少なくとも１つにキチ

ン・セルロース結合ドメインが付加されているヘテロマーペプチドである。

ここで、「キチン・セルロース結合ドメイン」とは、キチンおよび／またはセルロースに結合するペプチドドメインを指す。このようなドメインは、セルラーゼ（cellulase）、キシラナーゼ（Xylanase）、グルカナーゼ（Glucanase）およびキチナーゼ（Chitinase）などの酵素中によく見出される（P. Tomme et al., 1996, Ann. N. Y. Acad. Sci. 799: 418-424; T. Watanabe et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 4465-4472）。本発明で用いられるキチン・セルロース結合ドメインとしては、キチンおよび／またはセルロースに結合する限りその由来に制限はない。例えば、バシルス・サーキュランス（*Bacillus circulans*）由来のキチナーゼA1（GenBank Ac. No. M57601, J05599）の部分ペプチド（配列番号：２２）が挙げられる。

ヘテロマーペプチドを担体に固定化するために、キチン・セルロース結合ドメイン以外の高分子ポリマー結合性のペプチドドメインを用いることも考えられる。このようなペプチドドメインとしては、ポリマー分子資化酵素の基質結合ドメインが挙げられる。例えば、ポリ（ヒドロキシアルカン酸）（PHA）デポリメラーゼのPHA結合ドメイン（T. Fukui et al., 1988. Biochim. Biophys. Acta 952: 164-171; A. Behrends et al., 1996, FEMS Microbiol. Lett. 143: 191-194; M. Shinomiya et al., 1997, FEMS Microbiol. Lett. 154: 98-94）や、ポリウレタン（PUR）を分解する酵素（PURエステラーゼ等）のPUR表面結合ドメイン（T. Nakajima-Kambe et al., 1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 134-140）、その他の固体ポリエステル分解酵素ファミリーの基質結合ドメインなどを用いることが考えられる。また、ポリヒドロキシブチル酸（PHB）デポリメラーゼの基質結合ドメイン（K. Kasuya et al., 1999, Int. J. Biol. Macromol. 24: 329-36）を用いることもできる。これらのペプチドドメインを用いた場合は、それぞれのペプチドドメインが結合するポリマーを担体としてヘテロマーペプチドを固定化することができる。

本発明のヘテロマーペプチドは、公知の遺伝子組換え技術を用いて組換え蛋白

質として調製することが可能である。すなわち、目的のヘテロマーペプチドのサブユニットをコードするDNAに、キチン・セルロース結合ドメインをコードするDNAを、蛋白質の読み枠が一致するように結合し、該サブユニットと該キチン・セルロース結合ドメインとの融合蛋白質を産生させればよい。キチン・セルロース結合ドメインを融合させる位置は、ヘテロマーペプチドが形成され、かつそのペプチド本来の活性が維持される限り特に制限はない。例えば、キチン・セルロース結合ドメインを1つのサブユニットのN末端またはC末端に付加したり、サブユニットポリペプチド内に挿入したりすることが可能である。

本発明のヘテロマーペプチドの由来としては、前駆体ペプチドの切断により生成される任意のヘテロマーペプチドを用いることができる。このようなペプチドとしては、例えば、ホルモン、サイトカイン、酵素、シグナル伝達因子、受容体などが含まれる。サブユニット同士が、例えばジスルフィド結合などにより結合されているものも含まれる。このような蛋白質としては、例えばインスリン、インスリン受容体、NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体、HGF (hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子) などが挙げられるがこれらに制限されない。

天然型ペプチドにキチン・セルロース結合ドメインが付加されるペプチドとしては、天然型のアミノ酸配列からなるペプチドであってもよく、また、天然型ペプチドのアミノ酸配列が、1または複数のアミノ酸の置換、欠失、付加および/または挿入により改変されたペプチドであってもよい。このようなアミノ酸配列の改変は、ヘテロマーペプチドの安定性や活性を向上させるために行われ得る。

本発明のヘテロマーペプチドとしては、好ましくは自己スプライシングにより生成される蛋白質である。自己スプライシングとは、プロテアーゼなどの他の分子の触媒作用によらず、自律的に前駆体ペプチドの切断とヘテロマーの生成を行って蛋白質の活性を発現することを意味する。

このような蛋白質には、インテイン (Intein; Pietrokovski, S., 1998, Protein Sci. 7: 64-71)、N末求核型加水分解酵素 (N-terminal nucreophile Hydrolase;

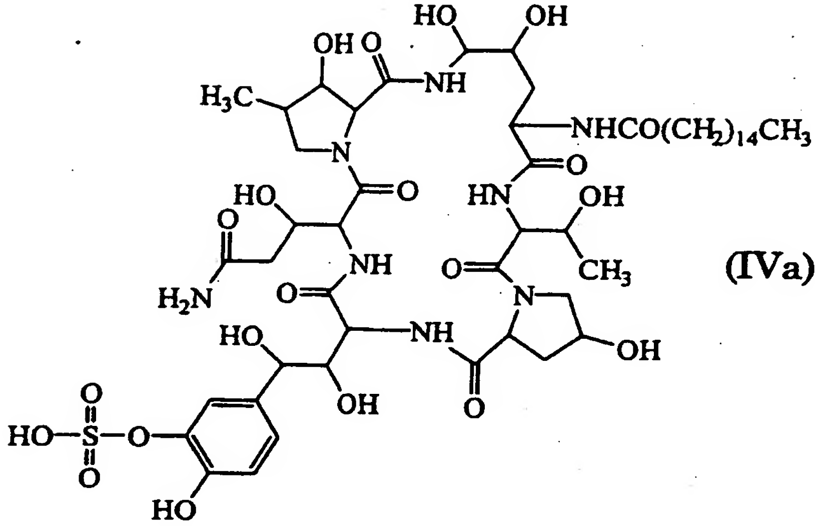
Ntn) (J. A. Brannigan et al., 1995, Nature 378: 416-419)、アミノアシラーゼ類等の蛋白質が含まれる。例えば、インテインには、酵母膜 ATPase (Chong, S. et al., 1998, J. Biol. Chem., 273: 10567-77; Chong, S. et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 22159-68)、およびピロコッカス・コダカラエンシス (*Pyrococcus kodakaraensis*) DNA ポリメラーゼ (Nishioka, M. et al., 1998, Nucleic Acids Res. 26: 4409-12) などが含まれる。また、N末求核型加水分解酵素には、例えば、バクテリアグリコシルアスパラギナーゼ (bacterial glycosylasparaginase) (Liu, Y. et al., 1998, J. Biol. Chem. 273: 9688-94)、プロテアソーム (proteasome) (Ditzel, L. et al., 1998, J. Mol. Biol. 279: 1187-91)、およびペニシリンアシラーゼ等が含まれる。

中でも、本発明における好ましいヘテロマーペプチドはアミノアシラーゼである (Sudhakaran, V. K. et al., 1992, Process Biochemistry 27: 131-143)。アミノアシラーゼとは、アシルアミノ基を加水分解してアミノ基とする反応を触媒する酵素である。本発明において、アミノアシラーゼには、例えばペニシリンアシラーゼ (Oh, S. J. et al., 1987, Gene 56: 87-97; Verhaert, R. M. et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3412-8)、セファロスポラン酸アシラーゼ (Matsuda, A et al., 1987, J. Bacteriol. 169: 5821-6; Sudhakaran, V. K. et al., 1992, Process Biochemistry 27: 131-143; Aramori, I. et al., 1991, J. Fermentation Bioengineering 72: 232-243)、および Aculeasin A様の環状リポポリペプチドアシラーゼやエキノカンジンBデアシラーゼ (*A. utahensis*由来リポペプチドアシラーゼ) (Inokoshi, J. et al., 1992, Gene 119: 29-35; 特開平4-228072; 国際公開番号WO97/32975) のような蛋白質が含まれる。

これらのアミノアシラーゼの中でも、7－β－(4－カルボキシブタンアミド)－セファロスポラン酸アシラーゼ (「GL-7ACAアシラーゼ」と略す) は、上述のように工業的有用性の高い酵素である (例えば Ishii, Y. et al., 1995, Eur. J. Biochem. 230: 773-8; Saito, Y. et al., 1996, Annals. N. Y. Acad. Sci. 782:

226-240; 都築勝昭ら, 1989, Nippon Nogeikagaku Kaishi 63: 1847-1853 等を参照)。GL-7ACAアシラーゼは、例えば FERM BP-3425 で特定されるシュードモナス・メンドーシナ (*Pseudomonas mendocina*) C427 株由来の蛋白質が好適に用いられる (特開平7-313161参照)。C427 株由来のGL-7ACAアシラーゼにキチン・セルロース結合ドメインが付加されている本発明のヘテロマーペプチドとしては、例えば配列番号：１７、１９、または２１に記載のアミノ酸配列からなる前駆体ペプチドから生成されるヘテロマーペプチドが好適に用いられるが、これらに制限されない。また、*Pseudomonas* 属由来の V22 (Aramori, I. et al., 1991, J. Fermentation Bioengineering 72: 232-243)、および A14 (Aramori, I. et al., 1992, J. Fermentation Bioengineering 73: 185-192) などを用いることもできる。

また、上記の環状リポペプチドアシラーゼとしては、環状リポペプチドのアシルアミノ基を脱アシル化する活性を有する限り特に制限はない。本発明において「環状リポペプチド」とは、ポリペプチド環を有し、該環上に側鎖としてアシルアミノ基を有する化合物を言う。該化合物は、さらに他の側鎖を有していてもよい。該環状リポペプチドの例としては、前記構造式 (IV) で示される化合物が挙げられる。この化合物には、下記構造式 [IVa] で示される FR901379物質 (特開平3-184921号公報に記載) が含まれる。環状リポペプチドアシラーゼとしては、より具体的には、例えば *Streptomyces* 属由来の環状リポペプチドアシラーゼが例示できる。*Streptomyces*属由来の環状リポペプチドアシラーゼは、例えば国際公開番号 WO97/32975号公報および国際特許出願番号 PCT/JP00/04285号に記載されている。例えば、*Streptomyces* sp. NO. 6907株 (国際公開番号 WO97/32975号公報参照) 由来の環状リポペプチドアシラーゼにキチン・セルロース結合ドメインが付加されている本発明のヘテロマーペプチドとしては、配列番号：２８に記載のアミノ酸配列からなる前駆体ペプチドから生成されるヘテロマーペプチドが好適に用いられるが、これらに制限されない。



(IVa)

本発明の前駆体ペプチドは、キチン・セルロースへの結合活性を有し、かつ目的とする活性を有するヘテロマーを構成できるものである限り、任意のアミノ酸配列からなるペプチドとすることができる。したがって、アミノアシラーゼを構成する前駆体ペプチドとして示した、（ａ）配列番号：１７、配列番号：１９、配列番号：２１、および配列番号：２８に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドに加えて、たとえば次の（ｂ）または（ｃ）に記載のペプチドも、本発明における前駆体ペプチドとして利用することができる。

（ｂ）配列番号：１７、配列番号：１９、配列番号：２１、および配列番号：２８に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつキチン・セルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド

（ｃ）配列番号：１６、配列番号：１８、配列番号：２０、および配列番号：２7に記載の塩基配列からなる群から選択されるいずれかの塩基配列を有するＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるＤＮＡによってコードされ、かつキチン・セルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を

有するヘテロマーを構成することができるペプチド

人工的に突然変異体を作製する方法としては、例えば、部位特異的突然変異誘発が挙げられる。より具体的には当該方法を用いて配列番号：１６、配列番号：１８、配列番号：２０、および配列番号：２７に記載の塩基配列に任意の変異をもたらすことにより、本発明の前駆体ペプチドの変異体を得ることができる。

本発明の前駆体ペプチドをコードする遺伝子は、配列番号：１６、配列番号：１８、配列番号：２０、および配列番号：２７に示される塩基配列から実質的になるＤＮＡの、全部または一部を含むものである。本発明の前駆体ペプチドをコードする遺伝子は、上記特定の塩基配列からなるＤＮＡに加えて、ストリンジェントな条件において、上記の特定塩基配列からなるＤＮＡとハイブリダイズし得る塩基配列からなるＤＮＡを含む。本発明では、塩基配列において約６０％以上の相同性を有するＤＮＡがハイブリダイズし得る条件をストリンジェントな条件という。ストリンジェンシーはハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができる。あるいは本発明の前駆体ペプチドをコードする遺伝子は、上記の特定塩基配列において少なくとも(1)６０％の同一性、(2)７０％の同一性、(3)８０％の同一性、(4)９０％の同一性、または(5)９５％の同一性を有する塩基配列からなる遺伝子を含む。当該遺伝子がコードする前駆体ペプチドは、キチン・セルロース結合活性を備え、かつアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構築しうる前駆体ペプチドを含む。

また本発明は、上記本発明のヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドに関する。また、本発明は、該前駆体ペプチドをコードするDNA、および該DNAを含む発現ベクター、該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関する。前駆体ペプチドは、これをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、該培養物から該前駆体ペプチドを回収することによって調製することができる。前駆体ペプチドをコードするDNAの由来としては、cDNAであっても、ゲ

ノムDNAであっても、また合成DNAであってもよい。また、本発明の前駆体ペプチドをコードするDNAには、天然型遺伝子の塩基配列を含むDNAのみならず、コドンの縮重に基づく任意の塩基配列を含むDNAが含まれる。

前駆体ペプチドをコードするDNAを構築するには、公知の遺伝子工学的技術を用いて、キチン・セルロース結合ドメインを付加しようとする部位に、キチン・セルロース結合ドメインをコードするDNAをフレームが一致するように挿入すればよい。前駆体ペプチドの発現によりヘテロマーペプチドが生成し、本来の酵素活性を維持するかぎり、キチン・セルロース結合ドメインを挿入する位置に制限はなく、各サブユニットのN末端、C末端、または中間に挿入され得る。キチン・セルロース結合ドメインは、ヘテロマーペプチドを構成する少なくとも１つの任意のサブユニットに挿入することができる。また、複数のサブユニットに対して挿入することもできる。例えば、GL-7ACAアシラーゼにおいては、αまたはβサブユニットのN末端、C末端、または中間にキチン・セルロース結合ドメインを挿入することにより、ヘテロマーペプチドが構成され、酵素活性が維持される。該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、具体的には、例えば配列番号：１６、１８、または２０に記載の塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、例えば、Streptomyces sp. NO. 6907株由来の環状リポペプチドアシラーゼの 大サブユニットのC末端にキチン・セルロース結合ドメインが挿入されたヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドをコードするDNAとしては、具体的には、例えば配列番号：２７に記載の塩基配列を有するDNAが挙げられる。キチン・セルロース結合ドメインが挿入される位置はこれに限定されず、任意のサブユニットのN末端、C末端、または中間に挿入することができる。

以下、組換えDNA技術による調製法について、その詳細を説明する。宿主細胞としては特に制限はないが、例えば細菌が挙げられる。細菌としては、エシェリキア（*Escherichia*）属に属する菌株（例えば *E. coli* JM109 ATCC 53323, *E. coli* HB101 ATCC 33694, *E. coli* MN102, *E. coli* HB101-16 FERM BP-1872, *E. coli* 294

ATCC 31446など)、バシラス(*Bacillus*)属に属する菌株(バシラス・サチリス(*Bacillus subtilis*)など)などが例示される。また、放線菌、例えばストレプトマイセス(Streptomyces)属に属する菌株(ストレプトマイセス・リビダンス(Streptomyces lividans)など)も挙げられる。例えば、エシェリキア属に属する菌株、具体的には *E. coli* HB101または *E. coli* JM109 などが好適に用いられる。また、T7 プロモーターが組み込まれた発現ベクター系を用いて蛋白質を発現させる場合は、T7 RNA ポリメラーゼをコードするDNAがゲノムに組み込まれた大腸菌(例えば NEB社製の ER2566等)などが好適である。

細菌、特に *E. coli*を宿主細胞として用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーターーオペレーター領域、開始コドン、本発明のヘテロマーペプチドの前駆体のアミノ酸配列をコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

プロモーターーオペレーター領域は、プロモーター、オペレーター及びShine-Dalgarno(SD)配列(例えば、AAGG など)を含むものである。好ましくは、プロモーターーオペレーター領域は、常套的に用いられるプロモーターーオペレーター領域(例えば、*E. coli* のPL-プロモーター、trp-プロモーター、または T7 プロモーター等)を含んでいてもよい。好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン(ATG)が例示される。

本発明の前駆体ペプチドをコードするDNAは、本発明の前駆体ペプチドのアミノ酸配列をコードしうるDNAであれば特に制限されない。

本発明の前駆体ペプチドをコードするDNAは、従来の方法で調製することができる。例えば、DNA合成機を用いて、一部のまたは全てのDNAを合成したり、および/または形質転換体(例えば、*E. coli*)から得られる適切なベクター(プラスミド等)に挿入された天然型ヘテロマーペプチドの前駆体をコードする完全なDNA配列を適切な方法、例えば適切な酵素(例えば、制限酵素、アルカリホスファターゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼなど)での処

理に加えて、常套の変異方法、例えば、カセット変異法〔Tokunaga, T. et al., Eur. J. Biochem. Vol.153, p445-449 (1985) 参照〕、PCR変異法〔Higuchi, R. et al., Nucleic Acids Res. Vol.16, p7351-7367 (1988) 参照〕、クンケル法〔Kunkel, T. A. et al., Methods Enzymol. Vol. 154, p367 (1987)など参照〕のような適切な方法でキチン・セルロース結合ドメインをコードするDNAを付加することによって調製することができる。

終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TGAなど）が例示される。ターミネーター領域としては、天然または合成のターミネーター（例えば、合成fdファージターミネーターなど）が挙げられる。

複製可能単位とは、宿主細胞中においてその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNA化合物をいい、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（例えば、天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント）および合成プラスミドが含まれる。好適なプラスミドとしては、*E. coli*ではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物(pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）などが挙げられる。

発現ベクターはプロモーター、開始コドン、本発明の前駆体ペプチドのアミノ酸配列をコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位（プラスミド）に連結することによって調製できる。例えば、pETベクター（Novagen社）などが挙げられる。また、この際所望により、常法（例えば、制限酵素での消化、T4 DNAリガーゼを用いるライゲーション）により適当なDNAフラグメント(例えば、リンカー、他のレストリクションサイトなど)を用いることもできる。

形質転換体（形質移入体）は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製できる。発現ベクターの宿主細胞への導入〔形質転換（形質移入)〕は従来公知の技術（例えば、*E. coli*の場合は Kushner法など）を用いて行うことができる。本発明のヘテロマーペプチドおよび/またはその前駆体ペプチドは、上記

の如く調製される発現ベクターを含む形質転換体を栄養培地で培養することにより製造することができる。

栄養培地は、炭素源（例えば、グルコース、グリセリン、マンニトール、フルクトース、ラクトースなど）および無機窒素もしくは有機窒素源（例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カゼインの加水分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクトトリプトン、ビーフ抽出物など）を含んでいてもよい。また所望により、他の栄養源〔例えば、無機塩（例えば、二リン酸ナトリウムまたは二リン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム）、ビタミン類（例えば、ビタミンB1 ）、抗生物質（例えば、アンピシリン、カナマイシン）など〕を配合していてもよい。

形質転換体（形質移入体）の培養は、当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地の pH 及び培養時間は、目的のヘテロマーペプチドまたはその前駆体ペプチドの回収量が最も高くなるように選択される。通常 pH 5.5～8.5（好適には pH 7～7.5)、5～40℃（好適には 10～30℃）で 5～50時間行われる。但し、これらの条件は形質転換体により変り得る。

形質転換した宿主細胞を培地で培養し、宿主細胞および／またはその培養上清からヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを回収することによって、本発明のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを製造することができる。*E. coli* を宿主とした場合、本発明のテロマーペプチドまたはその前駆体ペプチドは、通常培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する。よって、これらのペプチドは例えば以下の方法により取得できる。まず、濾過および遠心等の常法により細胞を集め、当該細胞の細胞壁および／または細胞膜を、例えば超音波および／またはライソザイムで処理して細胞破片を得る。次に、得られる細胞破片を適当な水溶液（例えば、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100）に溶解する。そして該溶液から、天然または合成蛋白質を精製並びに単離するため

に一般に用いられる常法に従って本発明のヘテロマーペプチドまたはその前駆体ペプチドを単離、精製する。単離、精製方法としては、透析、ゲル濾過、本発明のヘテロマーペプチドまたはその前駆体ペプチドに対するモノクローナル抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー、適当な吸着材上でのカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどが例示される。得られたヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを、キチンおよび/またはセルロースに接触させることにより、キチンおよび/またはセルロースに固定化されたヘテロマーペプチドを製造することができる。また、好ましくは、細胞破砕液を適当なバッファー中にて直接キチンまたはセルロース担体と混合し、キチンまたはセルロースに対するアフィニティーにより精製することができる。

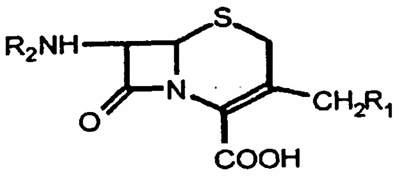
キチン・セルロース担体としては、結晶性キチン・セルロースであればよく、具体的には、バクテリオセルロース、コットンファイバー、キチン・セルロース成形ビーズなどが挙げられる。本発明のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドは、キチン・セルロース担体へ混合することにより固定される。これらの担体は、単一の素材からなるもののみならず、複数のキチン・セルロース素材を組み合わせたものや、あるいは他の素材とキチン・セルロース担体との組み合わせによって構成されるものであることもできる。キチン・セルロース結合ドメイン以外の高分子ポリマー結合ドメインを用いた場合も同様に、様々な形態に成形された高分子ポリマーを用いることが可能である。

このようにして調製された、キチンおよび/またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドは、種々の目的に使用することができる。例えば、物質代謝に関わる酵素が固定化された本発明の固定化ヘテロマーペプチドを利用して、種々の有用物質の製造を行うことが考えられる。そのための方法は、(a)本発明の固定化ヘテロマーペプチドに、該ヘテロマーペプチドの基質を接触させる工程、および(b)工程(a)における反応生成物を回収する工程、を含む。

固定化ヘテロマーペプチドとその基質との組み合わせに特に制限はないが、例えば、DNAポリメラーゼを固定化し、これにDNAとヌクレオチドを作用させて、DNAの合成を行わせることができる。また、GL-7ACAアシラーゼを含む各種アシラーゼを固定化し、抗生物質の誘導体の合成を行わせることもできる。

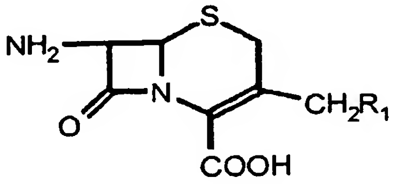
物質の製造以外の用途としては、たとえば、ヘテロマーペプチドに結合する化合物の精製に用いることができる。また、固定化したヘテロマーペプチドを用いて、該ペプチドの機能解析を行うこともできる。さらに、固定化ヘテロマーペプチドをバイオセンサーとして用いてもよい。

本発明の固定化ヘテロマーペプチドを用いた有用物質の製造は、例えば、固定化された７－β－（４－カルボキシブタンアミド）－セファロスポラン酸アシラーゼに、式：



(II)

（式中、R_1はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素、R_2は炭素数３～８のカルボキシアルカノイルまたはＤ－グルタミルを示す。）で示される化合物（II）またはその塩を接触させて、式：



(I)

（式中、R_1 は前記と同意義である。）で示される化合物（I）またはその塩を得ることを特徴とする化合物（I）を製造するために好適に用いられうる。

キチン・セルロース結合ドメインを付加された７－β－（４－カルボキシブタンアミド）－セファロスポラン酸アシラーゼの調製方法、および該アシラーゼの固定化は、例えば実施例に記載された方法に順じて行うことができる。

本発明でいう炭素数３～８のカルボキシアルカノイルとしては、直鎖状または分枝状のアシル基を有しているものが挙げられ､具体的にはカルボキシアセチル、カルボキシプロピオニル、カルボキシブチリル、カルボキシイソブチリル、カルボキシバレリル、カルボキシイソバレリル、カルボキシピバロイル、カルボキシヘキサノイル、カルボキシヘプタノイル等が例示される。

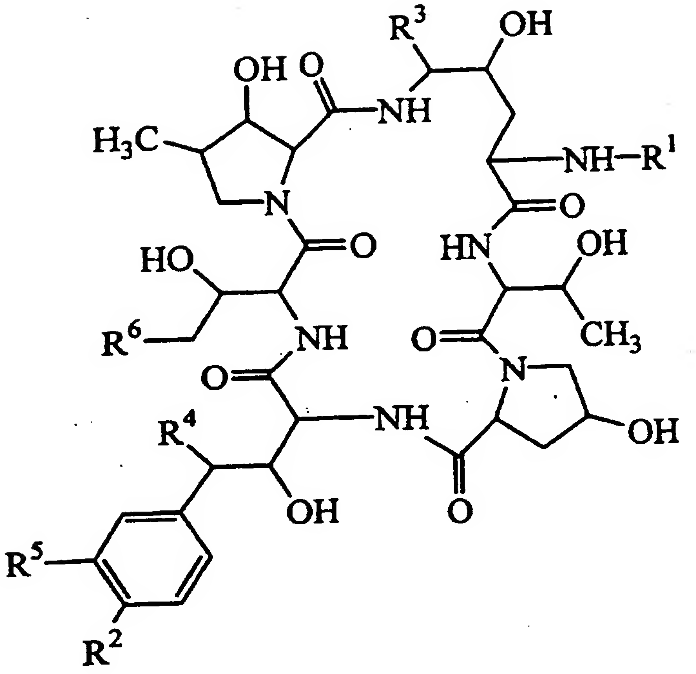
化合物（I）および化合物（II）の適当な塩としては、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩）が挙げられる。

上記化合物（I）の製造は、水または緩衝液のような水性媒質中で行うことができる。即ち、化合物（I）の製造は、通常、化合物（II）を含む水または緩衝液のような水性媒質中に固定化酵素を懸濁させることによって行われる。

化合物（I）の製造は、用いる固定化酵素の性質に応じて適宜好適な pH、化合物（II）の濃度、反応時間および反応温度を選択して行うことができる。 pHは通常 6～10、好ましくは pH 7～9、反応温度は通常 5～40℃、好ましくは 5～37℃、反応時間は通常 0.5～50時間である。

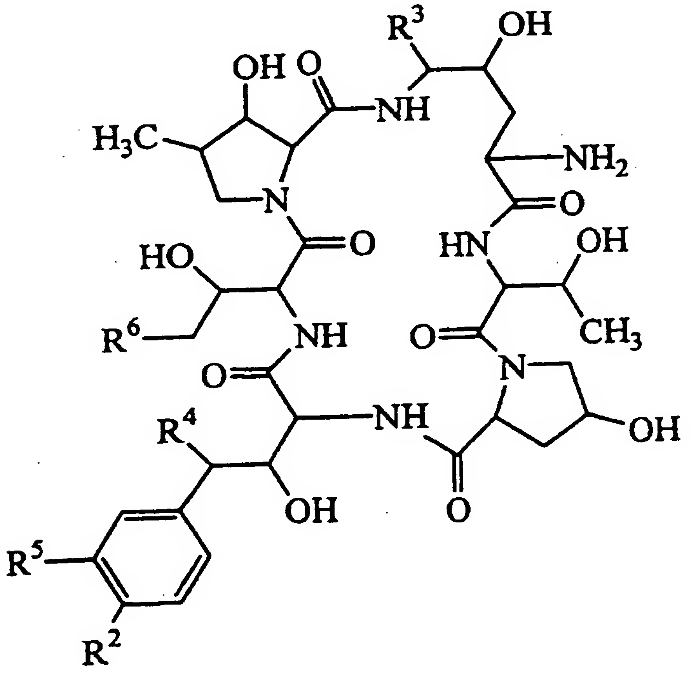
反応混液中、基質としての化合物（II）の濃度は、1～100 mg / mlの範囲で好適に選択することができる。このようにして製造される化合物（I）は、上記反応混液から慣用の方法で精製、単離される。

また、本発明の固定化ヘテロマーペプチドを用いた有用物質の製造は、例えば、固定化された環状リポペプチドアシラーゼに、式：



(IV)

（式中 R^1 はアシル基、R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、R^3 は水素またはヒドロキシ基、R^4 は水素またはヒドロキシ基、R^5 は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および R^6 は水素またはカルバモイル基を意味する）で示される化合物（IV）またはその塩を接触させて、式：



(III)

（式中、R^2、R^3、R^4、R^5 および R^6 は前記と同じ基を意味する）で示される化合物（III）またはその塩を得ることを特徴とする化合物（III）を製造するために好適に用いられうる。

キチン・セルロース結合ドメインを付加された環状リポペプチドアシラーゼの調製方法、および該アシラーゼの固定化は、例えば実施例に記載された方法に順じて行うことができる。また、国際公開番号 WO97/32975 号公報および国際特許出願番号 PCT/JP00/04285 に記載の方法に順じて行うことができる。

化合物（IV）および化合物（III）の適当な塩としては、慣用の無毒性のモノまたはジ塩であって、金属塩、例えばアルカリ金属塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等）、アンモニウム塩、有機塩基との塩（例えば、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン塩等）等、有機酸付加塩（例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等）、無機酸付加塩（例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等）、アミノ酸（例えばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等）との塩等が挙げられる。

上記化合物（III）の製造は、水または緩衝液のような水性媒質中で行うことができる。即ち、化合物（III）の製造は、通常、化合物（IV）を含む水または緩衝液のような水性媒質中に固定化酵素を懸濁させることによって行われる。

化合物（III）の製造は、用いる固定化酵素の性質に応じて適宜好適な pH、化合物（IV）の濃度、反応時間および反応温度を選択して行うことができる。 pH は通常５～１０、好ましくは pH６～９、反応温度は通常１０～７０℃、好ましくは３０～５０℃、反応時間は通常０．５～５０時間である。

反応混液中、基質としての化合物（IV）の濃度は、１～１００mg／mlの範囲で好適に選択することができる。このようにして製造される化合物（III）は、上記

BNSDOCID: <WO 0131038A1 I >

反応混液から慣用の方法、例えば減圧濃縮、凍結乾燥、抽出、pH調整、吸着樹脂、イオン交換樹脂、晶析、再結晶等の方法を適宜組み合わせて精製、単離される。

本発明における固定化反応に供したキチンまたはセルロース担体は、活性が低下したヘテロマーペプチドを溶離再生し、新たにヘテロマーペプチドを固定化することにより、繰り返し使用することが可能である。溶離剤としては、キチン・セルロース結合ドメインの性質に応じて、蛋白質変性剤（例えばグアニジン塩酸塩溶液、尿素溶液など)、界面活性剤（例えばドデシル硫酸ナトリウム溶液など)、低極性溶剤（例えば脱塩水、エチレングリコール溶液など）等から選択でき、ヘテロマーペプチドの再固定化は、未使用の場合と同様の方法で行うことが可能である。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

図１は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたペプチド（C427 GL-7ACAアシラーゼ）の発現プラスミドの構造を示す図である。CBDはキチンまたはセルロース結合ドメイン、αおよびβはそれぞれαサブユニットおよびβサブユニット、SPはスペーサーペプチドを表す。T7は T7 プロモーターを表す。

図２は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたペプチド（C427 GL-7ACAアシラーゼ）の発現プラスミド（pETSS427、pETNα427、pETCβ427、および pETCα427）または空ベクター（pET24a）を導入した大腸菌抽出物の SDS-PAGE（Ａ）および抗C427 GL-7ACAアシラーゼポリクローナル抗体を用いたウェスタン解析（Ｂ）の結果を示す写真である。

図３は、大腸菌で発現させたキチン・セルロース結合ドメインを融合させたペプチド（C427 GL-7ACAアシラーゼ）のキチンビーズ抽出物の SDS-PAGE を示す写真である。

図４は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させた環状リポペプチドアシラーゼ（TA6907アシラーゼ）をコードするプラスミド pUAYCBD の構造を示す図である。

図５は、キチン・セルロース結合ドメインを融合させた環状リポペプチドアシラーゼ（TA6907アシラーゼ）をコードする放線菌発現プラスミド pJAYCBD の構造を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

［実施例１］ CBD融合GL-7ACAアシラーゼ発現プラスミドの構築

pUC427の構築

pYS9107KプラスミドDNA（特開平7-313161）を、Stu IおよびCla Iで消化して3つの断片に切断し、切断末端をクレノウフラグメントを用いて平滑化した。これを１％のアガロースゲルで電気泳動し、C427 GL-7ACAアシラーゼ（特開平7-313161; Y. Ishii et al., 1994, J. Fermentation Bioengineering 77: 591-597）のORFを含む 2170 bpのフラグメントを分取した。これとは別に、pUC19プラスミドDNAを Kpn Iで消化した後に、同様に平滑末端化し、１％アガロースゲル電気泳動により分取した。両DNAフラグメントを、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、大腸菌DH5αにカルシウム法にてトランスフォーメーションした。大腸菌から精製したプラスミドDNAを Bam HI で消化した場合に、約 600 bpの断片が切り出されることを指標としてアンピシリン耐性菌をスクリーニングし、pUC19のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子と逆の向きに C427 GL-7ACAアシラーゼ遺伝子が組み込まれているプラスミドを選択し、pUC427とした。

pETSS427の構築

大腸菌をホストとして、さまざまな遺伝子産物を高発現することで知られてい

るpETシステム（Novagen社製）プラスミドに、分泌シグナルを除いたC427 GL-7ACAアシラーゼ遺伝子を組み込んだ。

α鎖の5'末端に開始コドンであるATG配列を導入するため、pUC427プラスミドDNAをテンプレートとし、プライマー1、2、および pfu DNAポリメラーゼを用いたPCR反応で約 600 bpの断片を増幅した。得られた断片を Bam HI および Nde I で切断し、同様の制限酵素で切断した pUC427 に組み込み pUCSS427 を得た。さらに、このプラスミドを Sac I および Nde I で切断し、同様の制限酵素で切断した pET24a プラスミドに組み込んでpETSS427を構築した（図１）。pETSS427プラスミドの融合蛋白質のコード領域の塩基配列を配列番号：１４に、この塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号：１５に示す。

<u>pETNα427の構築</u>

C427 GL-7ACAアシラーゼ α鎖をコードするDNAの5'末端にCBDを連結発現するプラスミドを構築した。α鎖とCBDは Kpn Iサイトで連結した。

CBDとして、ペプチド精製用に用いられる IMPACT™ T7 system (New England BioLabs社製) の発現用プラスミドであるpTYB2のCBDコード領域より、プライマー3、および 4を用いたPCR反応により、約 150 bpの断片を増幅した。pTYB2は、バシルス・サーキュランス（*Bacillus circulans*）キチナーゼA1由来のCBDを保持している（T. Watanabe et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 4465-4472; GenBank Accession No. M57601, J05599)。C427 GL-7ACAアシラーゼ α鎖をコードするDNAの5'末端に Kpn Iサイトを導入するため、pUC427プラスミドをテンプレートとしてプライマー5、および 2を用いたPCR反応により約 600 bpの断片を増幅した。増幅したCBD断片を Nde I、Kpn Iで、C427 GL-7ACAアシラーゼ遺伝子の5'末端断片を Kpn I、Bam HIでそれぞれ消化した。これらを Nde I、Bam HIで消化したpETSS427プラスミドに組み込み、pETNα427プラスミドとした（図１）。pETNα427プラスミドの融合蛋白質のコード領域の塩基配列を配列番号：１６に、この塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号：１７に示す。配列番号：１６の 1位～165位（配

列番号：１７の 1位～55位）がCBDに相当する。

pETCβ427の構築

C427 GL-7ACAアシラーゼβ鎖をコードするDNAの3'末端にCBDを連結発現するプラスミドを構築した。β鎖とCBDは Kpn Iサイトで連結した。

CBDとして、ペプチド精製用に用いられる IMPACT™ T7 system (New England BioLabs社製）の発現用プラスミドであるpTYB2のCBDコード領域より、プライマー6、および7を用いたPCR反応により、約 150 bpの断片を増幅した。C427 GL-7ACAアシラーゼβ鎖をコードするDNAの3'末端に Kpn Iサイトを導入するため、pUC427プラスミドをテンプレートとしてプライマー8、および 9を用いたPCR反応により約 150 bpの断片を増幅した。増幅したCBD断片を Sac I、Kpn Iで、C427 GL-7ACAアシラーゼ遺伝子の3'末端断片を Kpn I、Mlu Iでそれぞれ消化した。これらを Sac I、Mlu Iで消化したpUC427プラスミドに組み込み、pUCCβ427プラスミドを得た。さらに、このプラスミドを Sac Iおよび Nde Iで切断し、同様の制限酵素で切断したpET24aプラスミドに組み込み、pETCβ427を得た（図１）。pETCβ427プラスミドの融合蛋白質のコード領域の塩基配列を配列番号：１８に、この塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号：１９に示す。配列番号：１８の 2077位～2238位（配列番号：１９の 693位～746位）がCBDに相当する。

pETCα427の構築

C427 GL-7ACAアシラーゼα鎖をコードするDNAの3'末端から、3アミノ酸（9 bp）上流にCBDを連結発現するプラスミドを構築した。CBDの両端は、Kpn Iサイトで連結した。

CBD連結部位に Kpn Iサイトを導入するため、pUC427プラスミドをテンプレートとしてプライマー1、および 10を用いたPCR反応により増幅した約 600 bpの断片と、プライマー11、および 12を用いて増幅した約 500 bpの断片を調製した。これらの断片を、Nde I と Kpn I、Kpn I と Nco I でそれぞれ消化し、Nde Iおよび Nco Iで切断したpETSS427プラスミドに組み込み、pET427CαKpを得た。

CBDとして、ペプチド精製用に用いられる IMPACT™ T7 system (New England BioLabs社製) の発現用プラスミドであるpTYB2のCBDコード領域より、プライマー6、および 4を用いたPCR反応により、約 150 bpの断片を増幅した。増幅したCBD断片を Kpn I 消化し、Kpn I で消化した pET427Cα Kpプラスミドに組み込み、pETCα427プラスミドを得た（図１）。pETCα427プラスミドの融合蛋白質のコード領域の塩基配列を配列番号：２０に、この塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号：２１に示す。配列番号：２０の 484位～ 651位（配列番号：２１の 162位～ 217位）がCBDに相当する。

配列の確認

PCR増幅部分の塩基配列は、以下に示すプライマーを用いて、蛍光標識サイクルシークエンス法により確認した。

pETSS427

プライマー2（アンチセンス）β(5rev)

プライマー13（センス）T7promoter

pETNα427

プライマー2（アンチセンス）β(5rev)

プライマー13（センス）T7promoter

プライマー5（センス）427Kp5

pETCα427

プライマー13（センス）T7promoter

プライマー2（アンチセンス）β(5rev)

プライマー12（アンチセンス）Nco(under3)

プライマー4（アンチセンス）CBDKp3

pETCβ427

プライマー6（センス）CBDKp5

プライマー8（センス）Mlu(upver2)

プライマー配列

用いたプライマー配列を以下に示す。

プライマー1（センス）427Nd5：5'-GCGTCGCCGGTACCCTGGCCGAGCCGA-3'（配列番号：1）

プライマー2（アンチセンス）β(5rev)：5'-CGCCTCGTAGTAGGTGAAGTAG-3'（配列番号：2）

プライマー3（センス）CBDNd5：5'-TGAACTCACATATGACGACAAATCCTGGTG-3'（配列番号：3）

プライマー4（アンチセンス）CBDKp3：5'-CCTTCCTGGGTACCTTGAAGCTGCCACAAG-3'（配列番号：4）

プライマー5（センス）427Kp5：5'-GCGTCGCCGGTACCCTGGCCGAGCCGA-3'（配列番号：5）

プライマー6（センス）CBDKp5：5'-TGAACTCAGGTACCACGACAAATCCTGGTG-3'（配列番号：6）

プライマー7(アンチセンス)CBDSTP3：5'-TCATTGAAGCTGCCACAAGGC-3'（配列番号：7）

プライマー8（センス）Mlu(upver2)：5'-ATGAGCTACGGCAATTCTCG-3'（配列番号：8）

プライマー9（アンチセンス）427Kp3：5'-GGTCAGGCGGTAACCTGGCTTGAAGTT-3'（配列番号：9）

プライマー10（アンチセンス）427insKp3：5'-GGCGGGTCGGTACCGCCCAGGGTGCGGCCGGGCGACGCGA-3'（配列番号：１０）

プライマー11（センス）427insKp5：5'-GCCGCACCGGTACCGAGGGCGACCCGCCGGACCTGG-3'（配列番号：１１）

プライマー12（アンチセンス）Nco(under3):5'-CCGTGATCATGTCGAAATACTGCTCG-3'（配列番号：１２）

プライマー13（センス）T7promoter：5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'（配列番号：13）

［実施例２］ 組換え菌の培養法

調製したそれぞれのプラスミドは、カルシウム法により、ホストである大腸菌ER2566株にトランスフォーメーションした。それぞれの形質転換株１白金耳量を、3 mL / 15 mL試験管のLB培地に植菌し、37℃で約15時間培養した。この培養液 1 mLを、100 mL / 500 mLフラスコのLB培地に植菌し、30℃で A_{600} が 0.5〜0.6になるまで培養し、ここで、1 mM 濃度となるようにIPTGを加えた。IPTGの添加により、組み込んだ遺伝子の発現が誘導される。誘導開始後、培養温度を20〜25℃として、さらに20〜40時間培養し、0.2〜0.5 U / mL－培養液の酵素活性を発現した（1 unitは、GL-7ACAを基質として1分間に1 μmolの7ACAを生成する酵素量をいう）。

培養終了後、培養液を5℃、4000 rpmで10分間遠心することにより菌体を回収し、5 mLの20 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.5、500 mM NaCl、0.1 % Triton X-100に再懸濁した。懸濁液を超音波破砕機で、氷冷下、1分破砕を３回繰り返した後、5℃ 12000 rpmで10分間遠心し、酵素可溶化溶液として上澄画分を得た。

［実施例３］ キチンビーズへの酵素固定化法

菌体懸濁および吸着用緩衝液（以下、吸着緩衝液とする；20 mM Tris-HCl緩衝液 pH 8.5、500 mM NaCl、0.1 % Triton X-100）で平衡化、分散したキチンビーズ（New England BioLabs社製）に、酵素活性が 0.5〜5 U/ ml の濃度となるように可溶化酵素液を添加した。これを、5℃で5時間以上振盪混合し、酵素をキチンビーズに吸着させ、酵素固定化ビーズを得た。

酵素固定化ビーズは、5℃で、3000 rpm、10分間遠心沈降させ回収し、吸着緩衝液による再懸濁、再遠心回収を2回繰り返すことにより洗浄した。

［実施例４］ 固定化酵素の性質

pETNα427、pETCα427、pETCβ427形質転換大腸菌からの可溶化酵素液を吸着、回収、洗浄した固定化ビーズのアシラーゼ活性を測定した。

グルタリル-7ACA（基質）末を、0.15 M Tris-HCl緩衝液（pH 8.7）に10 mg / mLの濃度に溶解し、酵素固定化ビーズ液を、約 1～3 U / mLの活性になるように調製した。小試験管内で、37℃、約 5分間プレインキュベートした基質液 0.9 mL に酵素固定化ビーズ液 0.1 mL を添加混合し、37℃で5分間反応した。時間経過後、1 mLの4％酢酸を添加し、反応を停止させ、イオン交換水でさらに 3倍に希釈後、HPLCにて以下の条件で7ACA濃度を定量した。

7ACA HPLC定量法

カラム： ODS (Lichrospher RP-18) 5 μm 4 φ× 250 mm

移動相： 5 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム

0.1 M クエン酸

14.4% アセトニトリル

希釈液： 0.05 M クエン酸－0.1 M リン酸２ナトリウム緩衝液 (pH 3.0)

流量： 1.1 mL / min.

検出： UV 254 nm

注入量： 5 μL

生成した7ACAの量から、活性計算式「7ACA濃度（μg / ml）×6×10／5／272.4×酵素液調製時希釈倍数」により酵素活性を測定した。ここで "6" は反応後希釈倍数、 "10" は反応時酵素液希釈倍数、 "5" は反応時間 (min.)、 "272.4" 7ACA分子量を表す。

その結果、pETNα427、pETCα427、pETCβ427形質転換大腸菌からの可溶化酵素液を吸着、回収、洗浄した固定化ビーズでは、約 0.9 / mg-dryビーズの活性が確認された一方で、pETSS427 形質転換大腸菌からの固定化ビーズでは、活性は確認されなかった(表１)。また、固定化する前の酵素可溶化溶液を用いて同様の活性

測定を行った結果、酵素の発現活性は、キチンビーズへの吸着の前後でほとんど変化しないことも分かった。

表1

キチンビーズへの結合能	
	U / mg-dryビーズ
pETSS427	0
pETNα427	0.86
pETCβ427	0.86
pETCα427	0.85

各形質転換大腸菌からの可溶化酵素液を、抗C427 GL-7ACAアシラーゼポリクローナル抗体を含むウサギ血清を用いたウエスタンブロッティング法により検出したところ、pETNα427、pETCα427、および pETCβ427 形質転換大腸菌の発現酵素では、C427 GL-7ACAアシラーゼのα鎖、β鎖とCBDの連結が予想できるバンドのシフトがそれぞれ確認されたが、pETSS427 形質転換大腸菌の場合では、バンドのシフトは確認されなかった（図２）。

このことから、キチンビーズへの吸着は、C427 GL-7ACAアシラーゼに連結したCBDの働きによるものであることが明らかとなった。

さらに、固定化ビーズを、SDS-PACEサンプル緩衝液で直接処理し、SDS-PAGE分析を行ったところ、高純度に精製されていることが確認された（図３）。

また、ホスト大腸菌が並産する、基質、生成物の分解触媒作用を示すβラクタマーゼ活性を測定した。まず、30 mL の培養液から回収した菌体を破砕し、20 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.5、500 mM NaCl、0.1 % Triton X-100（吸着緩衝液）1 mL で抽出した可溶化酵素液を培養液サンプルとした。この可溶化酵素液 1 mL を用いて、GL-7ACAアシラーゼ活性が 0.5 U/mg-dryビーズとなるようにキチンビーズに固定化した。これを吸着緩衝液 1 mL に懸濁して、固定化後サンプルとした。次に、7ACA（基質）末を、0.15 M リン酸緩衝液 pH 8.0 に10 mg / mLの濃度になるよう溶解して、これを基質液とした。基質液 9 mLに対して、培養液サンプルま

たは固定化後サンプルまたはブランクとして吸着緩衝液を 1 mL 添加混合し、25℃で120分間振盪反応した。時間経過後、反応液 0.25 mLを 1 mLの 4%酢酸溶液に添加し、反応を停止させ、イオン交換水で、これを 20 mLまでメスアップした。7ACA濃度をHPLCにて上記と同様に定量し、分解した7ACAの量から、活性計算式「(ブランク7ACA濃度(μg / ml)－サンプル7ACA濃度(μg / ml)) ／120／272.4×80×10／30」により酵素活性を測定した。ここで、"120" は反応時間(min.)、"272.4" は7ACA分子量、"80" は反応後希釈倍数、"10" は反応時サンプル希釈倍数、"30" は培養液に対するサンプル調整時濃縮倍数を表す。

その結果、酵素固定化ビーズ液中にβラクタマーゼ活性は認められず、C427 GL-7ACAアシラーゼが高純度に精製されていることが判明した（表２）。

表２

	βラクタマーゼ活性 (mU / ml)	
	培養液	固定化後
pETNα427	0.88	< 0.10
pETCβ427	1.31	< 0.10
pETCα427	1.56	< 0.10

［実施例５］ CBD融合環状リポペプチドアシラーゼ発現形質転換体の構築

Streptomices sp. No. 6907株（FERM BP-5809；WO97/32975号公報；当該株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東１丁目１番３号）に寄託されている、原寄託日平成８年３月８日、国際寄託日（移管）平成９年２月３日）由来のFR901379アシラーゼ（WO97/32975号公報参照；本発明において Streptomices sp. No. 6907株由来の当該アシラーゼを「TA6907アシラーゼ」とも称す）のC末端側にバシルス・サーキュランス由来のCBDが連結された蛋白質を、放線菌をホストとして発現するプラスミドを構築する。TA6907アシラーゼとCBDとは Kpn I サイトで連結する。

CBDとして、ペプチド精製用に用いられる IMPACT™ T7 system (New England

SDOCID: <WO___0131038A1_I_>

Biolabs社製）の発現用プラスミドであるpTYB2のCBDコード領域より、プライマー14（配列番号：２３）、およびプライマー15（配列番号：２４）を用いたPCR反応により、約150bpの断片を増幅する。増幅された断片の5' 末端にはKpn Iサイト、3' 末端には、終止コドンとBam HIサイトが導入されている。pSB（WO97/32975号公報参照）中のTA6907アシラーゼコード領域より、ユニークサイトであるNot Iサイトから3' 末端までの約900bpの断片を、プライマー16（配列番号：２５）および 17（配列番号：２６）を用いたPCR反応により増幅する。増幅された断片の3' 末端にはKpn Iサイトが導入されている。

pSBをNot IおよびBam HIで消化し、約5000bpの断片を得る。増幅したCBD断片をBam HIとKpn I、TA6907アシラーゼの3' 末端断片をKpn IおよびNot Iで消化し、得られる3つのDNA断片を3ピースライゲーションにより繋ぎ、pUAYCBDを得る（図４）。pUAYCBDのアシラーゼコード領域を含む Sac I サイトから Bam HI サイトまでの塩基配列を配列番号：２７に、このDNAによりコードされるCBDを融合したTA6907アシラーゼの開始コドンと予想される９５３番目からの翻訳アミノ酸配列を配列番号：２８に示す。配列番号：２７の ３３７１位～３５２６位（配列番号：２８の８０７位～８５８位）がCBDに相当する。さらに、このプラスミドをSac Iおよび Bam HIで消化し、切り出した約3000bpの断片をSac IおよびBgl IIで消化した放線菌用ベクターpIJ702（WO97/32975号公報参照）に組み込み、pJAYCBDを得る（図５）。

「Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. The John Innes Foudation, Norwich, UK,1985.」に記載されている方法に従って、ストレプトマイセス・リビダンス 1326株（J. General Microbiology 1983, 129, 2703-2713）をpJAYCBDで形質転換する。得られた形質転換株のうち１株を選択し、ストレプトマイセス・リビダンス 1326/ pJAYCBDとする。

<u>プライマー配列</u>

用いたプライマー配列を以下に示す。

プライマー1（センス）CBDKp5：5'-AAGCCAGGTACCACGACAAATCC-3'（配列番号：23）

プライマー2（アンチセンス）CBDBam3：5'-AATTCGGGATCCCTATTGAAGCTGCC-3'（配列番号：24）

プライマー3（センス）AcyNot5：5'-CCAATGCGGAGCGGCCGCTGACCGGGTACG-3'（配列番号：25）

プライマー4（アンチセンス）AcyKp3：5'-CCGCCCACCGGTACCCCGCCGCTCGTGCAC-3'（配列番号：26）

［実施例6］ 形質転換株の培養およびFR901379アシラーゼの発現

5%シュクロース、1%グルコース、0.3%酵母エキス（Difco社）、0.5%バクトペプトン（Difco社）、0.3%肉エキス（Difco社）、5mM $MgCl_2$、0.5%グリシン、50 μg/ml のチオストレプトン（pH 6.5）からなる培地 10ml を100ml容三角フラスコに入れ、形質転換株ストレプトマイセス・リビダンス1326/pJAYCBD の5mm角の菌体を植菌する。30℃、3日間（260rpm）培養し、その培養液のFR901379アシラーゼ活性を測定し、FR179642（脱アシル化したFR901379物質）（いずれもWO97/32975号公報参照）を生成する活性を確認する。

当該アシラーゼ活性は以下のようにして測定することができる。

<アシラーゼ活性の測定>

100mg/ml FR901379（WO97/32975号公報参照）水溶液 0.1ml、リン酸緩衝液（pH 6.0）0.1ml、メタノール 0.1ml、蒸留水 0.6ml からなる溶液に、培養液もしくは、固定化酵素懸濁液 0.1ml を加え、37℃（125rpm）で反応させる。15分後、4%酢酸 1ml と蒸留水 2ml を添加することで、反応を終了させる。そして、生成したFR179642（脱アシル化したFR901379物質）を高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いて、以下の条件で定量する。

カラム；Kaseisorb LC PO Super (4.6 mm I.D. x 250 mm)（東京化成社）

カラム温度；50℃

溶離液；蒸留水：メタノール：リン酸＝960：40：1

流速；1 ml/min

検出；UV-215 nm

［実施例７］ 酵素の調製とキチンビーズへの酵素固定化

（１）発酵液の調製

500mL容フラスコに50mLのチオストレプトン（50μg/mL）を含むPM-1培地（6％日食#3600、3％脱脂大豆粉、0.5％$CaCO_3$、0.005％チオストレプトン、pH無修正）を入れ、形質転換株ストレプトマイセス・リビダンス 1326/ pJAYCBD の 5mm 角の菌体を植菌した後、30℃で3日間培養する。その 2.5mL を 50mL のSG培地（8％マルトース、3％脱脂大豆粉、3％脱脂小麦胚芽、0.5％$CaCO_3$、0.005％チオストレプトン、pH無修正）を入れた500mL容フラスコに植菌し、30℃で3日間培養する。

（２）CBDを融合したFR901379アシラーゼのキチンビーズへの固定化

発酵液 24mL に 4M KClを8mL加え、4℃で一晩放置した後、遠心（10,000rpm, 10分間）により得られた上清をKCl抽出液とする。水に分散したキチンビーズ(New England BioLabs社製)に、酵素活性が 0.5〜5 U の濃度となるように可溶化酵素液を添加する。これを、5℃で、5時間以上振盪混合し、酵素をキチンビーズに吸着させる。酵素固定化ビーズは、5℃で、3000rpm、10分間遠心沈降させ回収し、洗浄用緩衝液（20mM Tris-HCl緩衝液 pH8.5、500mM NaCl、0.1% TritonX 100）による再懸濁、再遠心回収を2回繰り返すことにより洗浄する。

CBD融合アシラーゼは、キチンビーズに対して高い吸着活性を示す。高純度に精製されていることは、固定化ビーズを、SDS-PAGEサンプル緩衝液で直接処理し、SDS-PAGE分析を行うことで確認することができる。

産業上の利用の可能性

本発明により、キチン・セルロース結合ドメインを融合させたヘテロマーペプチドが提供された。本発明により、工業的に有用であって、特異なプロセシング機構を持つ酵素を、活性を保持したまま固定化することが可能となる。キチンやセルロースは工業的にも利用可能な担体であり、これに吸着能を示すキチン・セルロース結合ドメインを用いた本発明のヘテロマーペプチドは、工業的利用に適している。キチン・セルロース結合ドメインのキチン・セルロースへの吸着は特異的であるが故に、吸着した酵素は高純度に精製されている。従って、通常の酵素固定化技術に比べ、酵素の精製が不要であるという点でも優位である。特に、大腸菌中には、セファロ骨格の化合物を分解する酵素のβラクタマーゼが存在しており、従来の固定化酵素法では、この酵素の除去が不可欠であったが、本発明の方法では簡便に除去できる。また、従来のイオン交換担体への固定化法では、担体への基質、生成物の吸着により生成物収率が低下したが、本発明の固定化方法は基質、生成物の吸着はないため、高い収率で固定化ヘテロマーペプチドを調製することが可能である。

請求の範囲

1．　前駆体ペプチドの切断により生成されるヘテロマーペプチドを構成するサブユニットの少なくとも１つがキチン・セルロース結合ドメインを付加されているヘテロマーペプチド。

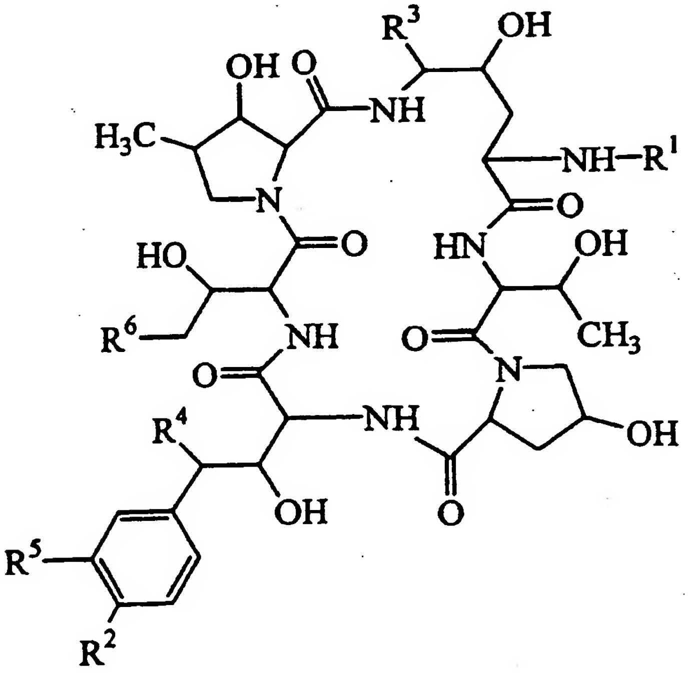
2．　ヘテロマーペプチドが自己スプライシングによって生成される蛋白質である、請求項１に記載のペプチド。

3．　自己スプライシングによって生成される蛋白質がアミノアシラーゼである、請求項２に記載のペプチド。

4．　アミノアシラーゼが７－β－（４－カルボキシブタンアミド）－セファロスポラン酸アシラーゼである、請求項３に記載のペプチド。

5．　自己スプライシングによって生成される蛋白質が環状リポペプチドアシラーゼである、請求項２に記載のペプチド。

6．　環状リポペプチドアシラーゼが式：



(IV)

（式中 R^1 はアシル基、R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、R^3 は水素

またはヒドロキシ基、R^4は水素またはヒドロキシ基、R^5は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、およびR^6は水素またはカルバモイル基を意味する）で示される化合物IVのアシル化を触媒するアシラーゼである、請求項５に記載のペプチド。

７．　請求項１に記載のヘテロマーペプチドの前駆体ペプチド。

８．　前駆体ペプチドが、以下の（ａ）、（ｂ）、または（ｃ）のいずれかのペプチドである請求項７に記載の前駆体ペプチド。

（ａ）配列番号：１７、配列番号：１９、配列番号：２１、および配列番号：２８に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むペプチド

（ｂ）配列番号：１７、配列番号：１９、配列番号：２１、および配列番号：２８に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、かつキチンまたはセルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド

（ｃ）配列番号：１６、配列番号：１８、配列番号：２０、および配列番号：２７に記載の塩基配列からなる群から選択されるいずれかの塩基配列を有するＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるＤＮＡによってコードされ、かつキチン・セルロースへの結合活性とアミノアシラーゼ活性を有するヘテロマーを構成することができるペプチド

９．　請求項８に記載の前駆体ペプチドをコードするＤＮＡ。

１０．　請求項９に記載のＤＮＡを含む発現ベクター。

１１．　請求項１０に記載の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞。

１２．　請求項１１に記載の宿主細胞を培地で培養し、宿主細胞および／またはその培養上清からヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを回収することを特徴とする、請求項１に記載のヘテロマーペプチドまた

は該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドの製造方法。

１３．　請求項１に記載のヘテロマーペプチドまたは該ヘテロマーペプチドの前駆体ペプチドを、キチンおよび／またはセルロースに接触させる工程を含む、固定化ヘテロマーペプチドの製造方法。

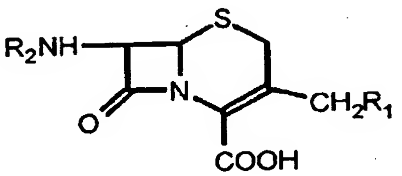
１４．　請求項１に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチド。

１５．　（ａ）請求項１４に記載の固定化ヘテロマーペプチドに、該ヘテロマーペプチドの基質を接触させる工程、および

（ｂ）工程（ａ）における反応生成物を回収する工程、を含む、固定化ヘテロマーペプチドに触媒されて生じる反応生成物の製造方法。

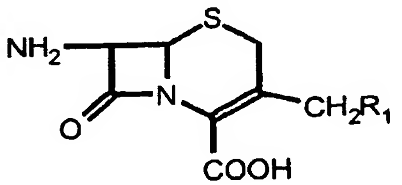
１６．　請求項４に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドに、

式：



(II)

（式中、R_1はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素、R_2は炭素数３～８のカルボキシアルカノイルまたはＤ－グルタミルを示す）で示される化合物（II）またはその塩を接触させて、式：



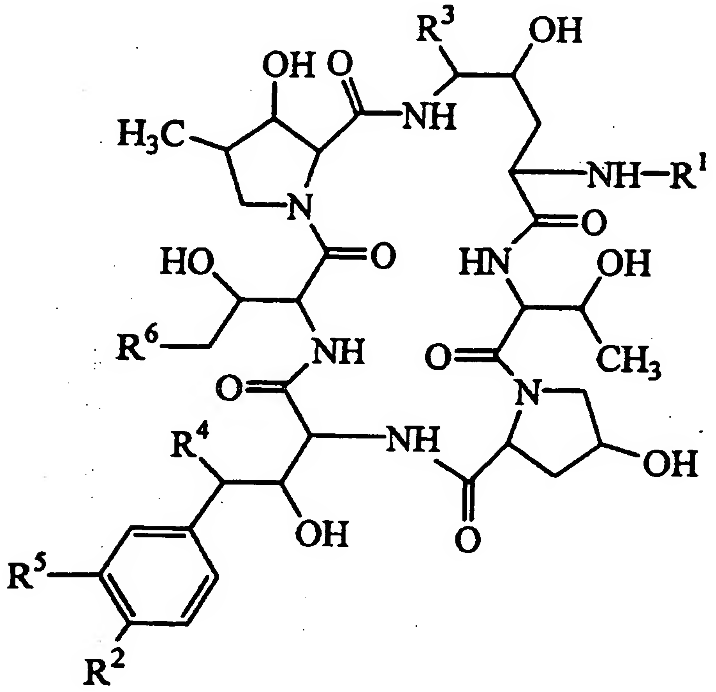
(I)

（式中、R_1はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素を示す）で示される化合物

（Ｉ）またはその塩を得ることを特徴とする化合物（I）の製造法。

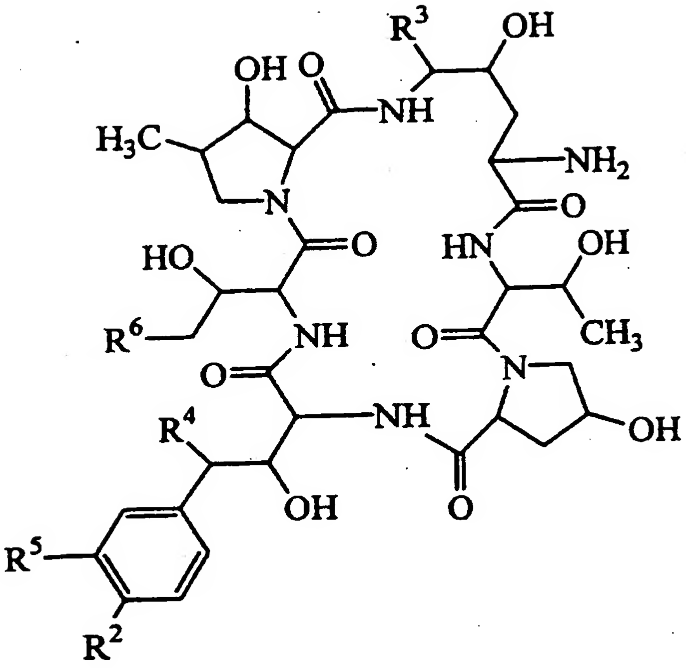
１７． 請求項６に記載のヘテロマーペプチドにおけるキチン・セルロース結合ドメインがキチンおよび／またはセルロースに結合している固定化ヘテロマーペプチドに、

式：



(IV)

（式中 R^1 はアシル基、R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、R^3 は水素またはヒドロキシ基、R^4 は水素またはヒドロキシ基、R^5 は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および R^6 は水素またはカルバモイル基を意味する）で示される化合物（IV）またはその塩を接触させて、式：

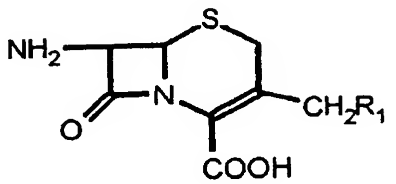


(III)

(式中、R^2、R^3、R^4、R^5 および R^6 は前記と同じ基を意味する）で示される化合物（III）またはその塩を得ることを特徴とする化合物（III）の製造法。

１８． ７－β－（４－カルボキシブタンアミド）－セファロスポラン酸アシラーゼを構成するサブユニットの少なくとも１つにキチン・セルロース結合ドメインを付加し、該キチン・セルロース結合ドメインをキチンおよび／またはセルロースに固定化してなる、

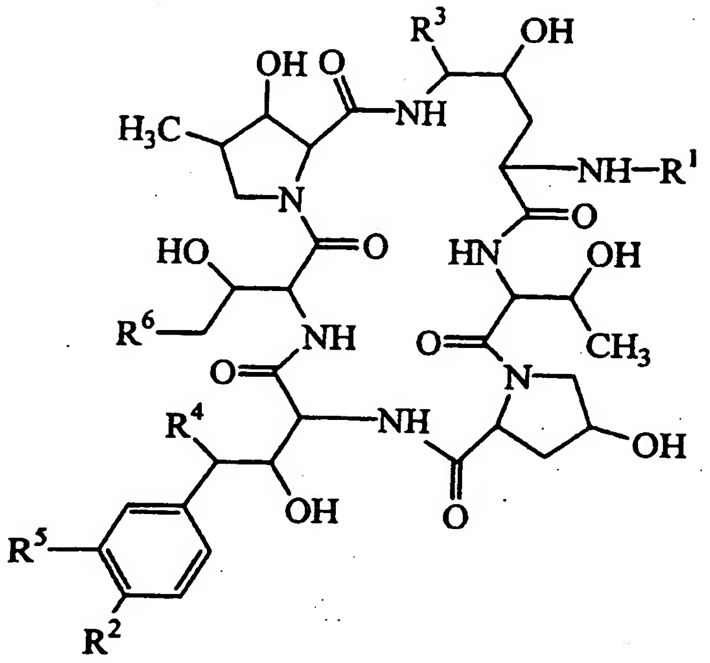
式：



(I)

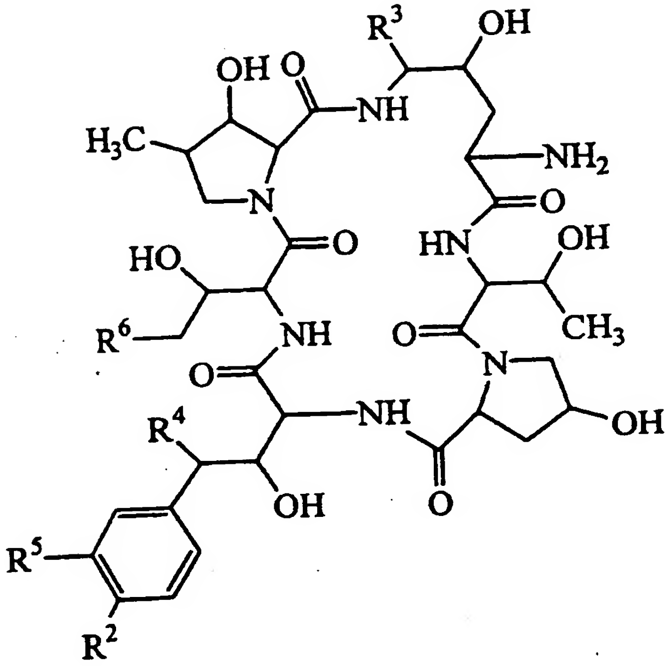
（式中、R_1 はアセトキシ、ヒドロキシまたは水素を示す）で示される化合物（Ｉ）製造用の固定化酵素。

１９． 式：



(IV)

（式中 R^1 はアシル基、R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、R^3 は水素またはヒドロキシ基、R^4 は水素またはヒドロキシ基、R^5 は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および R^6 は水素またはカルバモイル基を意味する）で示される化合物（IV）またはその塩のアシル化を触媒する環状リポペプチドアシラーゼを構成するサブユニットの少なくとも１つにキチン・セルロース結合ドメインを付加し、該キチン・セルロース結合ドメインをキチンおよび／またはセルロースに固定化してなる、式：



(III)

（式中、R^2、R^3、R^4、R^5 および R^6 は前記と同じ基を意味する）で示される化合物（III）製造用の固定化酵素。

図1

C427-CBD フュージョンペプチドの発現プラスミドの構築

CBD；セルロースまたはキチン結合ドメイン

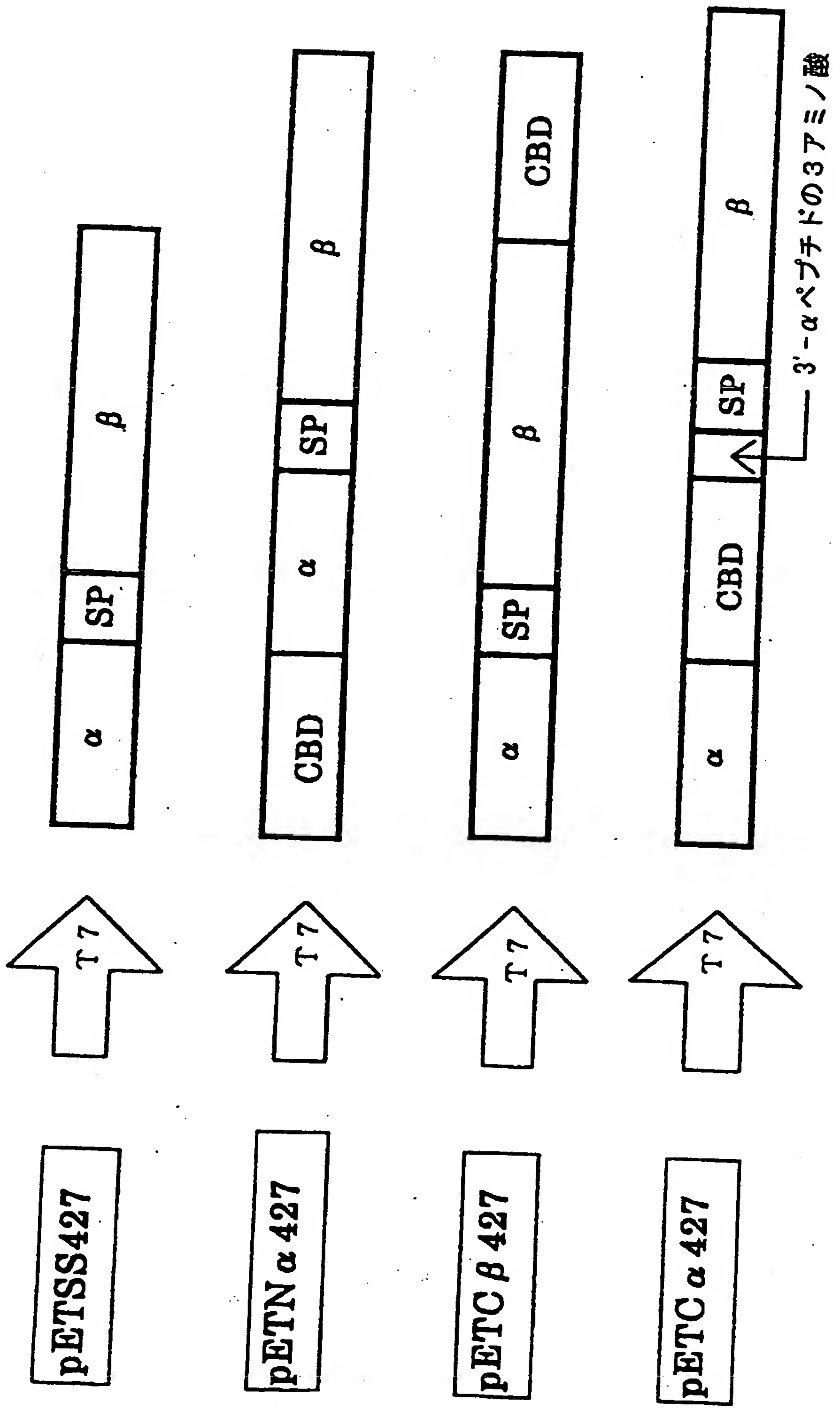
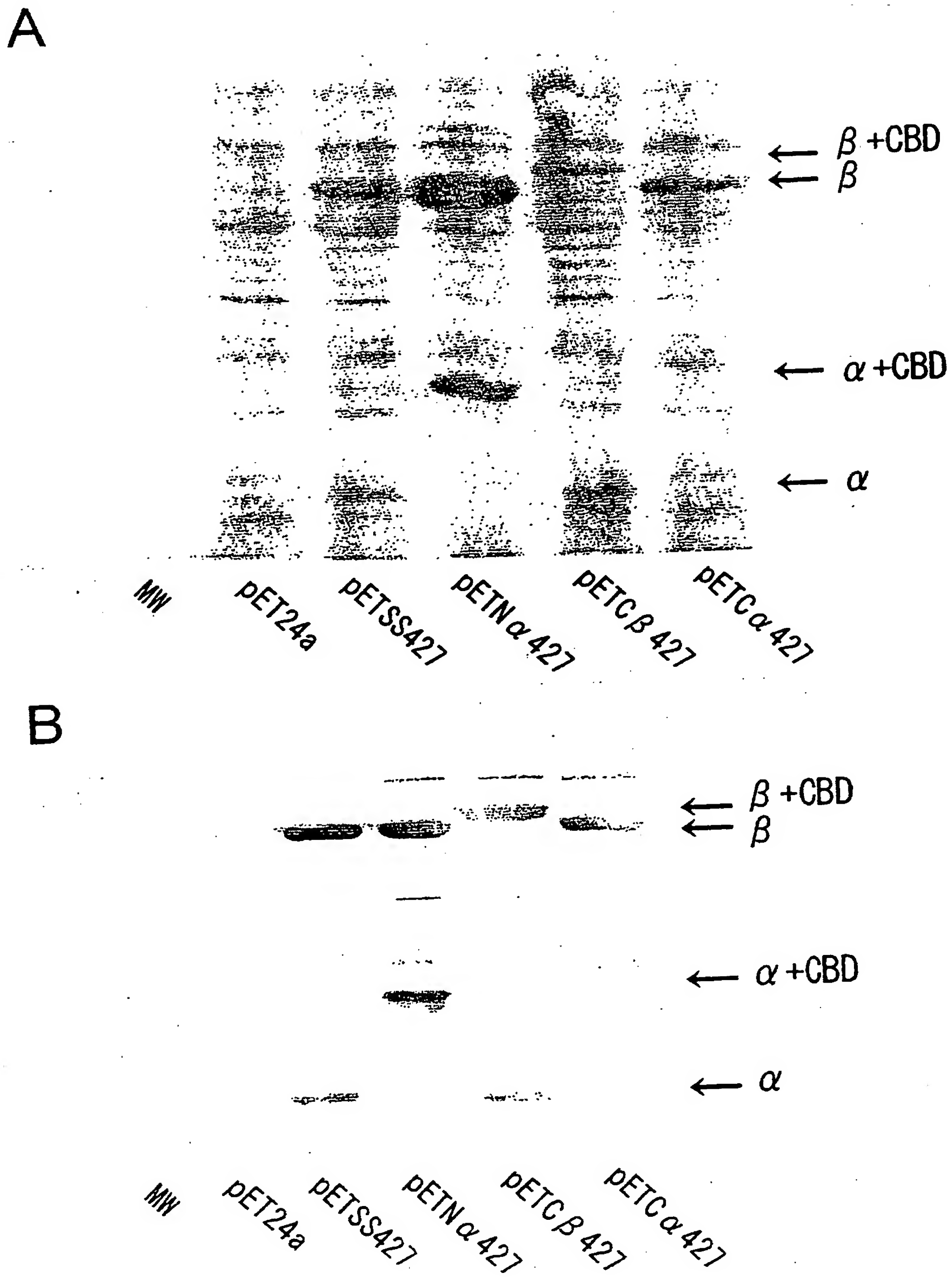
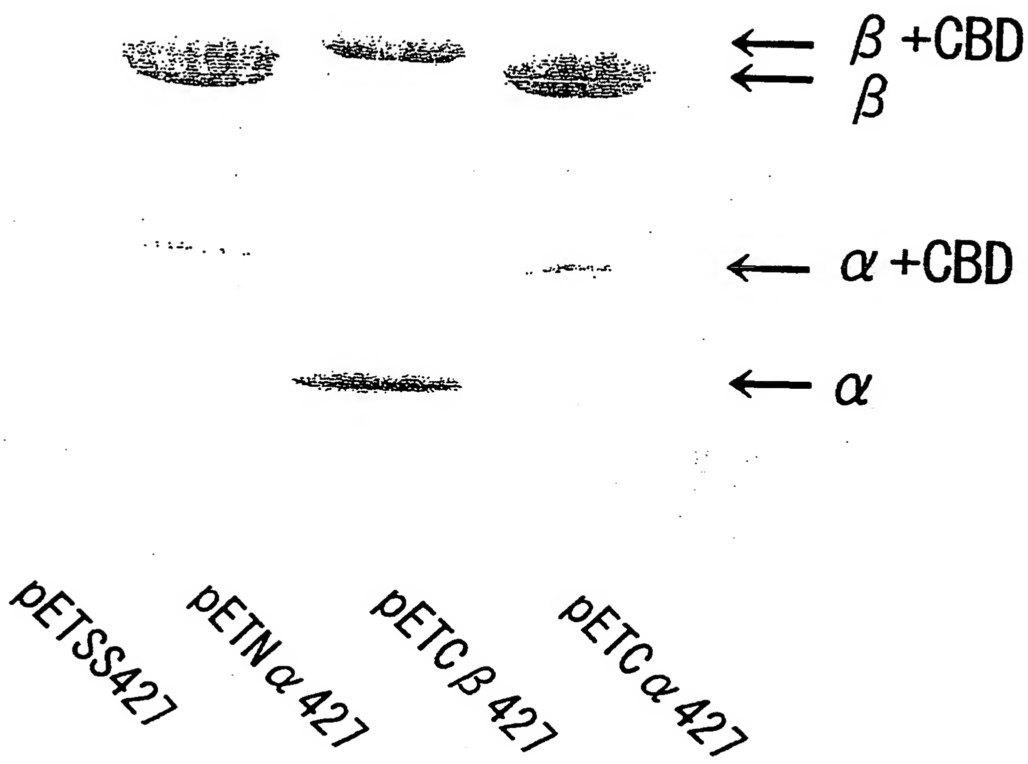


図2



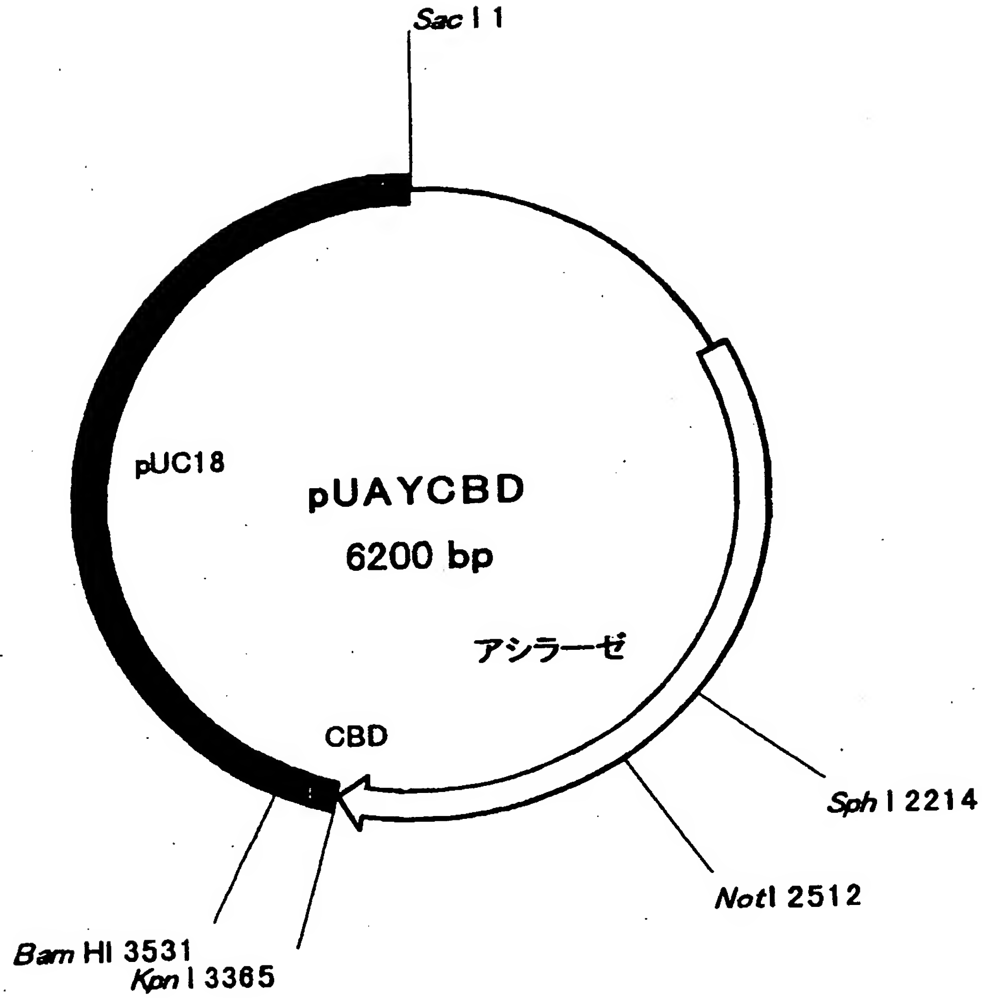
BEST AVAILABLE COPY

図3



BEST AVAILABLE COPY

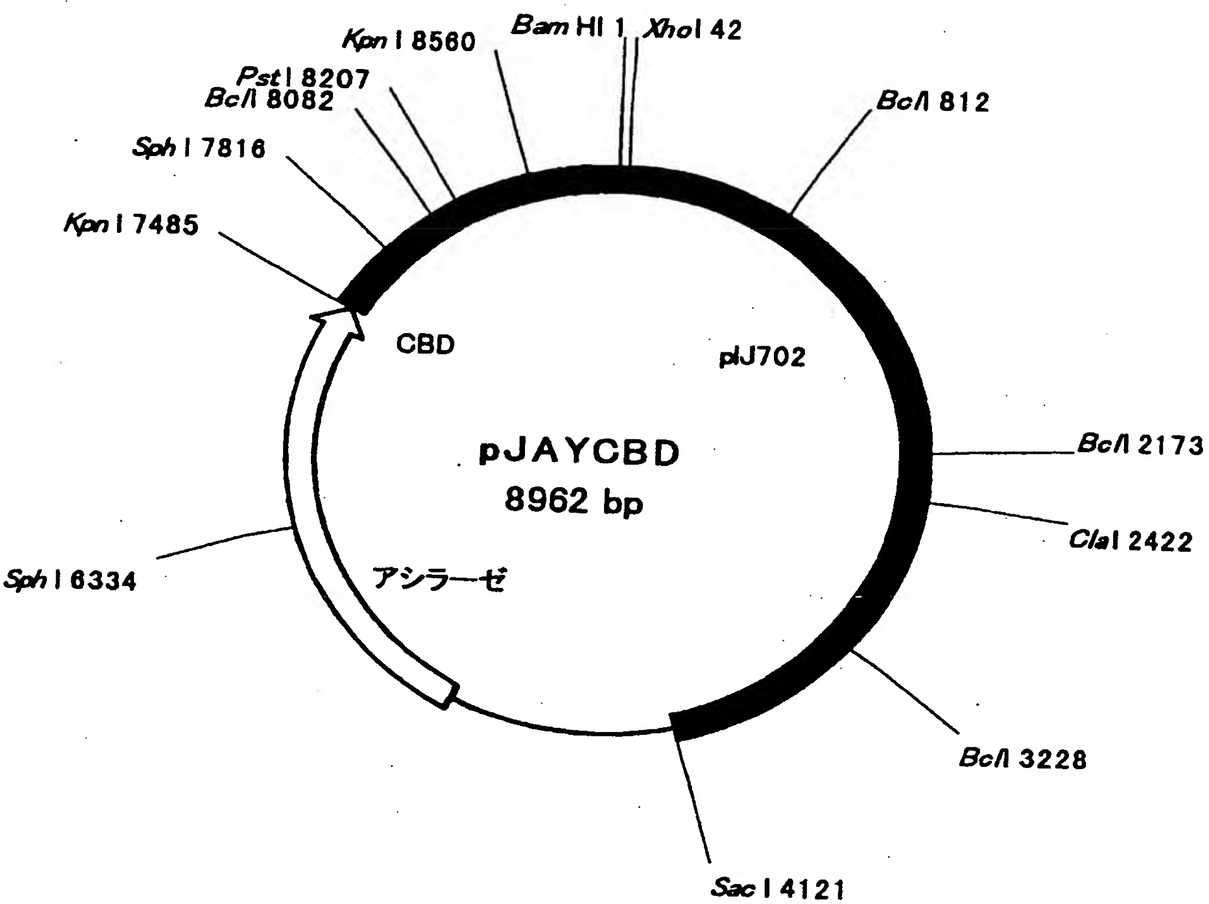
図４



Plasmid name: pUAYCBD

Plasmid size: 6200 bp

図5



Plasmid name: pJAYCBD

Plasmid size: 8962 bp

SEQUENCE LISTING

<110> FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Immobilization of Heteromer Peptide by Gene Engineering

<130> F3-104PCT

<140>
<141>

<150> JP 1999-301699
<151> 1999-10-22

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 1
gcgtcgccgg taccctggcc gagccga 27

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 2
cgcctcgtag taggtgaagt ag 22

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 3
tgaactcaca tatgacgaca aatcctggtg 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 4
ccttcctggg taccttgaag ctgccacaag 30

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 5
gcgtcgccgg taccctggcc gagccga 27

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 6
tgaactcagg taccacgaca aatcctggtg 30

BNSDOCID: <WO 0131038A1 I >

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 7
tcattgaagc tgccacaagg c 21

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 8
atgagctacg gcaattctcg 20

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 9
ggtcaggcgg taacctggct tgaagtt 27

<210> 10
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 10
ggcgggtcgg taccgcccag ggtgcggccg ggcgacgcga 40

<210> 11
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 11
gccgcaccgg taccgagggc gacccgccgg acctgg 36

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 12
ccgtgatcat gtcgaaatac tgctcg 26

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 13
taatacgact cactataggg 20

<210> 14
<211> 2078
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

BNSDOCID: <WO 0131038A1 I >

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized GL-7ACA acylase sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2078)

<400> 14
atg ctg gcc gag ccg acc tcg acg ccg cag gcg ccg att gcg gcc tat 48
Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr
1 5 10 15

aaa ccg aga agc aat gag atc ctg tgg gac ggc tac ggc gtc ccg cac 96
Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His
20 25 30

atc tac ggg gtc gac gcg ccc tca gcc ttc tac ggc tac ggc tgg gcc 144
Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala
35 40 45

cag gcg cgc agc cac ggc gac aat atc ctg cgc ctg tat gga gaa gcg 192
Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala
50 55 60

cgg ggc aag ggg gcc gaa tac tgg ggc ccg gat tac gaa cag acg acc 240
Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr
65 70 75 80

gtc tgg ctg ctg acc aac ggc gtg ccg gag cgc gcc cag cag tgg tat 288
Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr
85 90 95

gcg cag cag tcg cct gat ttc cgc gcc aac ctc gac gcc ttc gcg gcg 336
Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala
100 105 110

ggc atc aac gcc tat gcg cag cag aac ccc gac gac atc tcg ccc gag 384
Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu
115 120 125

gtg cgg cag gtg ctg ccg gtc tcc ggc gcc gac gtg gtg gcc cac gcc 432
Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala
130 135 140

cat cgc ctg atg aac ttc ctc tat gtc gcg tcg ccc ggc cgc acc ctg 480
His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu
145 150 155 160

ggc gag ggc gac ccg ccg gac ctg gcc gat cag gga tcc aac tcc tgg 528
Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp
165 170 175

gct gtg gcg ccg ggc aag acg gcc aat ggg aac gcc ctg ctg ctg cag 576
Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln
180 185 190

aac ccg cac ctg tcc tgg acg acg gac tac ttc acc tac tac gag gcg 624
Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala
195 200 205

cat ctc gtc acg ccg gac ttc gaa atc tat ggc gcg acc cag atc ggc 672
His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly
210 215 220

ctg ccg gtc atc cgc ttc gcc ttc aat cag cgg atg ggc atc acc aat 720
Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn
225 230 235 240

acc gtc aac ggc atg gtg ggg gcc acc aac tat cgg ctg acg ctt cag 768
Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln
245 250 255

ggc gac ggc tat ctg tat gac ggt cag gtg cgg ccg ttc gag cgg cgt 816
Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg
260 265 270

cag gct tcg tat cgc ctg cgt cag gcg gac ggg tcg acg gtc gac aag 864
Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys
275 280 285

ccg ttg gag atc cgt tcc agc gtc cat ggc ccg gtc ttc gag cgc gcg 912
Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala
290 295 300

gac ggc acg gcc gtc gcc gtt cgg gtc gcc ggt ctg gat cgg ccg ggc 960
Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly
305 310 315 320

atg ctc gag cag tat ttc gac atg atc acg gcg gac agc ttc gac gac 1008
Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp
325 330 335

tac gaa gcc gct atg gcg cgg atg cag gtg ccg acc ttc aac atc gtc 1056
Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val
340 345 350

BNSDOCID: <WO 0131038A1 I >

tac gcc gac cgc gaa ggg acc atc aac tac agc ttc acg gcg tgg cgc 1104
Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg
355 360 365

cca aac ggg ccg agg gcg aca tcg cct tct ggc agg ggc tcg gcc ggg 1152
Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly
370 375 380

cga ttc ctc gcg tta ctg tgg act gag aca cac ccc tgg acg atc tgc 1200
Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys
385 390 395 400

cgc gcg tca cca atc cgc cgg gcc gct tcg tgc aga act cca atg atc 1248
Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile
405 410 415

cgc cgt gga cgc cga cct ggc ccg tca cct aca cgc cca ggg act tcc 1296
Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser
420 425 430

cct cct atc tgg cgc ccc aga cgc gca ctc cct gcg cgc tca gca aag 1344
Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys
435 440 445

cgt gcg tct gat gtc gag aac gac gac ctg acg ctg gaa cgc ttc atg 1392
Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met
450 455 460

gcg ctg cag ttg agc cac cgc gcc gtc atg gcc gac cgc acc ttg ccg 1440
Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro
465 470 475 480

gac ctg atc ccg gcc gcc ctg atc gac ccc gat ccc gag gtc cag gcg 1488
Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala
485 490 495

gcg gcg cgc ctg ctg gcg gcg tgg gat cgt gag ttc acc agc gac agc 1536
Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser
500 505 510

cgc gcc gcc ctg ctg ttc gag gaa tgg gcg cgt ctg ttc gcc ggc cag 1584
Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln
515 520 525

aat ttc gcc ggc cag gcg ggt ttc gcc acg ccc tgg tcg ctg gat aag 1632
Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys
530 535 540

ccg gtc agc acc ccc tac ggc gtc cgc gac ccc aag gcc gcc gtc gat 1680
Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp
545 550 555 560

caa ctg cgg acc gcc atc gcc aac acc aag cgc aaa tac ggc gcg atc 1728
Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile
565 570 575

gac cgg ccg ttc ggc gac gcc tcg cgc atg atc ctg aac gat gtg att 1776
Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile
580 585 590

gtt ccg ggc gcc gcc ggc tac ggc aac ctg ggt tcc ttc cgg gtc ttc 1824
Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe
595 600 605

acc tgg tcc gat cct gac gaa aac ggg gtt cgc acg ccc gtc cac ggc 1872
Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly
610 615 620

gag acg tgg gtg gcg atg atc gag ttc tcc acc ccg gtg cgg gcc tat 1920
Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr
625 630 635 640

ggc ctg atg agc tac ggc aat tct cgc cag ccg ggc acg acg cac tac 1968
Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr
645 650 655

agc gat cag atc gaa cgc gtg tcg cgg gcc gac ttc cgc gag ctg ttg 2016
Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu
660 665 670

ctg cgg cga gag cag gtc gag gcc gcc gtc cag gaa cgc acg ccc ttc 2064
Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe
675 680 685

aac ttc aag cct ag 2078
Asn Phe Lys Pro
690

<210> 15
<211> 692
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 15

Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr
1 5 10 15

Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His
20 25 30

Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala
35 40 45

Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala
50 55 60

Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr
65 70 75 80

Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr
85 90 95

Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala
100 105 110

Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu
115 120 125

Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala
130 135 140

His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu
145 150 155 160

Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp
165 170 175

Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln
180 185 190

Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala
195 200 205

His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly
210 215 220

Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn
225 230 235 240

Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln
245 250 255

Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg
260 265 270

Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys
275 280 285

Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala
290 295 300

Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly
305 310 315 320

Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp
325 330 335

Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val
340 345 350

Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg
355 360 365

Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly
370 375 380

Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys
385 390 395 400

Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser
420 425 430

Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys
435 440 445

Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met
450 455 460

Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro
465 470 475 480

Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala
485 490 495

Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser
500 505 510

Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln
515 520 525

Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys
530 535 540

Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp
545 550 555 560

Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile
565 570 575

Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile
580 585 590

Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe
595 600 605

Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly
610 615 620

Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr
625 630 635 640

Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr
645 650 655

Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu
660 665 670

Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe
675 680 685

Asn Phe Lys Pro
690

<210> 16
<211> 2241
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized CBD-fused GL-7ACA acylase sequence

<220>
<221> CDS

<222> (1)..(2241)

<400> 16

atg acg aca aat cct ggt gta tcc gct tgg cag gtc aac aca gct tat 48
Met Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr
1 5 10 15

act gcg gga caa ttg gtc aca tat aac ggc aag acg tat aaa tgt ttg 96
Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu
20 25 30

cag ccc cac acc tcc ttg gca gga tgg gaa cca tcc aac gtt cct gcc 144
Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala
35 40 45

ttg tgg cag ctt caa ggt acc ctg gcc gag ccg acc tcg acg ccg cag 192
Leu Trp Gln Leu Gln Gly Thr Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln
50 55 60

gcg ccg att gcg gcc tat aaa ccg aga agc aat gag atc ctg tgg gac 240
Ala Pro Ile Ala Ala Tyr Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp
65 70 75 80

ggc tac ggc gtc ccg cac atc tac ggg gtc gac gcg ccc tca gcc ttc 288
Gly Tyr Gly Val Pro His Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe
85 90 95

tac ggc tac ggc tgg gcc cag gcg cgc agc cac ggc gac aat atc ctg 336
Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu
100 105 110

cgc ctg tat gga gaa gcg cgg ggc aag ggg gcc gaa tac tgg ggc ccg 384
Arg Leu Tyr Gly Glu Ala Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro
115 120 125

gat tac gaa cag acg acc gtc tgg ctg ctg acc aac ggc gtg ccg gag 432
Asp Tyr Glu Gln Thr Thr Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu
130 135 140

cgc gcc cag cag tgg tat gcg cag cag tcg cct gat ttc cgc gcc aac 480
Arg Ala Gln Gln Trp Tyr Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn
145 150 155 160

ctc gac gcc ttc gcg gcg ggc atc aac gcc tat gcg cag cag aac ccc 528
Leu Asp Ala Phe Ala Ala Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro
165 170 175

gac gac atc tcg ccc gag gtg cgg cag gtg ctg ccg gtc tcc ggc gcc 576

Asp Asp Ile Ser Pro Glu Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala
180 185 190

gac gtg gtg gcc cac gcc cat cgc ctg atg aac ttc ctc tat gtc gcg 624
Asp Val Val Ala His Ala His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala
195 200 205

tcg ccc ggc cgc acc ctg ggc gag ggc gac ccg ccg gac ctg gcc gat 672
Ser Pro Gly Arg Thr Leu Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp
210 215 220

cag gga tcc aac tcc tgg gct gtg gcg ccg ggc aag acg gcc aat ggg 720
Gln Gly Ser Asn Ser Trp Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly
225 230 235 240

aac gcc ctg ctg ctg cag aac ccg cac ctg tcc tgg acg acg gac tac 768
Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr
245 250 255

ttc acc tac tac gag gcg cat ctc gtc acg ccg gac ttc gaa atc tat 816
Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr
260 265 270

ggc gcg acc cag atc ggc ctg ccg gtc atc cgc ttc gcc ttc aat cag 864
Gly Ala Thr Gln Ile Gly Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln
275 280 285

cgg atg ggc atc acc aat acc gtc aac ggc atg gtg ggg gcc acc aac 912
Arg Met Gly Ile Thr Asn Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn
290 295 300

tat cgg ctg acg ctt cag ggc gac ggc tat ctg tat gac ggt cag gtg 960
Tyr Arg Leu Thr Leu Gln Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val
305 310 315 320

cgg ccg ttc gag cgg cgt cag gct tcg tat cgc ctg cgt cag gcg gac 1008
Arg Pro Phe Glu Arg Arg Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp
325 330 335

ggg tcg acg gtc gac aag ccg ttg gag atc cgt tcc agc gtc cat ggc 1056
Gly Ser Thr Val Asp Lys Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly
340 345 350

ccg gtc ttc gag cgc gcg gac ggc acg gcc gtc gcc gtt cgg gtc gcc 1104
Pro Val Phe Glu Arg Ala Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala
355 360 365

ggt ctg gat cgg ccg ggc atg ctc gag cag tat ttc gac atg atc acg 1152

```
Gly Leu Asp Arg Pro Gly Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr
    370                 375                 380

gcg gac agc ttc gac gac tac gaa gcc gct atg gcg cgg atg cag gtg     1200
Ala Asp Ser Phe Asp Asp Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val
385                 390                 395                 400

ccg acc ttc aac atc gtc tac gcc gac cgc gaa ggg acc atc aac tac     1248
Pro Thr Phe Asn Ile Val Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr
                405                 410                 415

agc ttc acg gcg tgg cgc cca aac ggg ccg agg gcg aca tcg cct tct     1296
Ser Phe Thr Ala Trp Arg Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser
            420                 425                 430

ggc agg ggc tcg gcc ggg cga ttc ctc gcg tta ctg tgg act gag aca     1344
Gly Arg Gly Ser Ala Gly Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr
        435                 440                 445

cac ccc tgg acg atc tgc cgc gcg tca cca atc cgc cgg gcc gct tcg     1392
His Pro Trp Thr Ile Cys Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser
    450                 455                 460

tgc aga act cca atg atc cgc cgt gga cgc cga cct ggc ccg tca cct     1440
Cys Arg Thr Pro Met Ile Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro
465                 470                 475                 480

aca cgc cca ggg act tcc cct cct atc tgg cgc ccc aga cgc gca ctc     1488
Thr Arg Pro Gly Thr Ser Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu
                485                 490                 495

cct gcg cgc tca gca aag cgt gcg tct gat gtc gag aac gac gac ctg     1536
Pro Ala Arg Ser Ala Lys Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu
            500                 505                 510

acg ctg gaa cgc ttc atg gcg ctg cag ttg agc cac cgc gcc gtc atg     1584
Thr Leu Glu Arg Phe Met Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met
        515                 520                 525

gcc gac cgc acc ttg ccg gac ctg atc ccg gcc gcc ctg atc gac ccc     1632
Ala Asp Arg Thr Leu Pro Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro
    530                 535                 540

gat ccc gag gtc cag gcg gcg gcg cgc ctg ctg gcg gcg tgg gat cgt     1680
Asp Pro Glu Val Gln Ala Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg
545                 550                 555                 560

gag ttc acc agc gac agc cgc gcc gcc ctg ctg ttc gag gaa tgg gcg     1728
```

SDOCID: <WO 0131038A1 I >

Glu Phe Thr Ser Asp Ser Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala
565 570 575

cgt ctg ttc gcc ggc cag aat ttc gcc ggc cag gcg ggt ttc gcc acg 1776
Arg Leu Phe Ala Gly Gln Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr
580 585 590

ccc tgg tcg ctg gat aag ccg gtc agc acc ccc tac ggc gtc cgc gac 1824
Pro Trp Ser Leu Asp Lys Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp
595 600 605

ccc aag gcc gcc gtc gat caa ctg cgg acc gcc atc gcc aac acc aag 1872
Pro Lys Ala Ala Val Asp Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys
610 615 620

cgc aaa tac ggc gcg atc gac cgg ccg ttc ggc gac gcc tcg cgc atg 1920
Arg Lys Tyr Gly Ala Ile Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met
625 630 635 640

atc ctg aac gat gtg att gtt ccg ggc gcc gcc ggc tac ggc aac ctg 1968
Ile Leu Asn Asp Val Ile Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu
645 650 655

ggt tcc ttc cgg gtc ttc acc tgg tcc gat cct gac gaa aac ggg gtt 2016
Gly Ser Phe Arg Val Phe Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val
660 665 670

cgc acg ccc gtc cac ggc gag acg tgg gtg gcg atg atc gag ttc tcc 2064
Arg Thr Pro Val His Gly Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser
675 680 685

acc ccg gtg cgg gcc tat ggc ctg atg agc tac ggc aat tct cgc cag 2112
Thr Pro Val Arg Ala Tyr Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln
690 695 700

ccg ggc acg acg cac tac agc gat cag atc gaa cgc gtg tcg cgg gcc 2160
Pro Gly Thr Thr His Tyr Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala
705 710 715 720

gac ttc cgc gag ctg ttg ctg cgg cga gag cag gtc gag gcc gcc gtc 2208
Asp Phe Arg Glu Leu Leu Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val
725 730 735

cag gaa cgc acg ccc ttc aac ttc aag cca tga 2241
Gln Glu Arg Thr Pro Phe Asn Phe Lys Pro
740 745

<210> 17
<211> 746
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 17
Met Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr
1   5   10   15

Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu
            20   25   30

Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala
        35   40   45

Leu Trp Gln Leu Gln Gly Thr Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln
    50   55   60

Ala Pro Ile Ala Ala Tyr Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp
65   70   75   80

Gly Tyr Gly Val Pro His Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe
                85   90   95

Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu
            100   105   110

Arg Leu Tyr Gly Glu Ala Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro
        115   120   125

Asp Tyr Glu Gln Thr Thr Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu
    130   135   140

Arg Ala Gln Gln Trp Tyr Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn
145   150   155   160

Leu Asp Ala Phe Ala Ala Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro
                165   170   175

Asp Asp Ile Ser Pro Glu Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala
            180   185   190

Asp Val Val Ala His Ala His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala
        195   200   205

Ser Pro Gly Arg Thr Leu Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp
    210   215   220

Gln Gly Ser Asn Ser Trp Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly
225 230 235 240

Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr
245 250 255

Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr
260 265 270

Gly Ala Thr Gln Ile Gly Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln
275 280 285

Arg Met Gly Ile Thr Asn Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn
290 295 300

Tyr Arg Leu Thr Leu Gln Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val
305 310 315 320

Arg Pro Phe Glu Arg Arg Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp
325 330 335

Gly Ser Thr Val Asp Lys Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly
340 345 350

Pro Val Phe Glu Arg Ala Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala
355 360 365

Gly Leu Asp Arg Pro Gly Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr
370 375 380

Ala Asp Ser Phe Asp Asp Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val
385 390 395 400

Pro Thr Phe Asn Ile Val Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr
405 410 415

Ser Phe Thr Ala Trp Arg Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser
420 425 430

Gly Arg Gly Ser Ala Gly Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr
435 440 445

His Pro Trp Thr Ile Cys Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser
450 455 460

Cys Arg Thr Pro Met Ile Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro
465 470 475 480

Thr Arg Pro Gly Thr Ser Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu
485 490 495

Pro Ala Arg Ser Ala Lys Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu
500 505 510

Thr Leu Glu Arg Phe Met Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met
515 520 525

Ala Asp Arg Thr Leu Pro Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro
530 535 540

Asp Pro Glu Val Gln Ala Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg
545 550 555 560

Glu Phe Thr Ser Asp Ser Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala
565 570 575

Arg Leu Phe Ala Gly Gln Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr
580 585 590

Pro Trp Ser Leu Asp Lys Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp
595 600 605

Pro Lys Ala Ala Val Asp Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys
610 615 620

Arg Lys Tyr Gly Ala Ile Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met
625 630 635 640

Ile Leu Asn Asp Val Ile Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu
645 650 655

Gly Ser Phe Arg Val Phe Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val
660 665 670

Arg Thr Pro Val His Gly Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser
675 680 685

Thr Pro Val Arg Ala Tyr Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln
690 695 700

Pro Gly Thr Thr His Tyr Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala
705 710 715 720

Asp Phe Arg Glu Leu Leu Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val
725 730 735

Gln Glu Arg Thr Pro Phe Asn Phe Lys Pro
740 745

<210> 18
<211> 2241
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized CBD-fused GL-7ACA acylase sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2241)

<400> 18
atg ctg gcc gag ccg acc tcg acg ccg cag gcg ccg att gcg gcc tat 48
Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr
1 5 10 15

aaa ccg aga agc aat gag atc ctg tgg gac ggc tac ggc gtc ccg cac 96
Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His
20 25 30

atc tac ggg gtc gac gcg ccc tca gcc ttc tac ggc tac ggc tgg gcc 144
Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala
35 40 45

cag gcg cgc agc cac ggc gac aat atc ctg cgc ctg tat gga gaa gcg 192
Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala
50 55 60

cgg ggc aag ggg gcc gaa tac tgg ggc ccg gat tac gaa cag acg acc 240
Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr
65 70 75 80

gtc tgg ctg ctg acc aac ggc gtg ccg gag cgc gcc cag cag tgg tat 288
Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr
85 90 95

gcg cag cag tcg cct gat ttc cgc gcc aac ctc gac gcc ttc gcg gcg 336
Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala
100 105 110

ggc atc aac gcc tat gcg cag cag aac ccc gac gac atc tcg ccc gag 384
Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu

115 120 125

gtg cgg cag gtg ctg ccg gtc tcc ggc gcc gac gtg gtg gcc cac gcc 432
Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala
130 135 140

cat cgc ctg atg aac ttc ctc tat gtc gcg tcg ccc ggc cgc acc ctg 480
His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu
145 150 155 160

ggc gag ggc gac ccg ccg gac ctg gcc gat cag gga tcc aac tcc tgg 528
Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp
165 170 175

gct gtg gcg ccg ggc aag acg gcc aat ggg aac gcc ctg ctg ctg cag 576
Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln
180 185 190

aac ccg cac ctg tcc tgg acg acg gac tac ttc acc tac tac gag gcg 624
Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala
195 200 205

cat ctc gtc acg ccg gac ttc gaa atc tat ggc gcg acc cag atc ggc 672
His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly
210 215 220

ctg ccg gtc atc cgc ttc gcc ttc aat cag cgg atg ggc atc acc aat 720
Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn
225 230 235 240

acc gtc aac ggc atg gtg ggg gcc acc aac tat cgg ctg acg ctt cag 768
Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln
245 250 255

ggc gac ggc tat ctg tat gac ggt cag gtg cgg ccg ttc gag cgg cgt 816
Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg
260 265 270

cag gct tcg tat cgc ctg cgt cag gcg gac ggg tcg acg gtc gac aag 864
Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys
275 280 285

ccg ttg gag atc cgt tcc agc gtc cat ggc ccg gtc ttc gag cgc gcg 912
Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala
290 295 300

gac ggc acg gcc gtc gcc gtt cgg gtc gcc ggt ctg gat cgg ccg ggc 960
Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly

305 310 315 320

atg ctc gag cag tat ttc gac atg atc acg gcg gac agc ttc gac gac 1008
Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp
325 330 335

tac gaa gcc gct atg gcg cgg atg cag gtg ccg acc ttc aac atc gtc 1056
Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val
340 345 350

tac gcc gac cgc gaa ggg acc atc aac tac agc ttc acg gcg tgg cgc 1104
Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg
355 360 365

cca aac ggg ccg agg gcg aca tcg cct tct ggc agg ggc tcg gcc ggg 1152
Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly
370 375 380

cga ttc ctc gcg tta ctg tgg act gag aca cac ccc tgg acg atc tgc 1200
Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys
385 390 395 400

cgc gcg tca cca atc cgc cgg gcc gct tcg tgc aga act cca atg atc 1248
Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile
405 410 415

cgc cgt gga cgc cga cct ggc ccg tca cct aca cgc cca ggg act tcc 1296
Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser
420 425 430

cct cct atc tgg cgc ccc aga cgc gca ctc cct gcg cgc tca gca aag 1344
Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys
435 440 445

cgt gcg tct gat gtc gag aac gac gac ctg acg ctg gaa cgc ttc atg 1392
Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met
450 455 460

gcg ctg cag ttg agc cac cgc gcc gtc atg gcc gac cgc acc ttg ccg 1440
Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro
465 470 475 480

gac ctg atc ccg gcc gcc ctg atc gac ccc gat ccc gag gtc cag gcg 1488
Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala
485 490 495

gcg gcg cgc ctg ctg gcg gcg tgg gat cgt gag ttc acc agc gac agc 1536
Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser

500 505 510

cgc gcc gcc ctg ctg ttc gag gaa tgg gcg cgt ctg ttc gcc ggc cag 1584
Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln
515 520 525

aat ttc gcc ggc cag gcg ggt ttc gcc acg ccc tgg tcg ctg gat aag 1632
Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys
530 535 540

ccg gtc agc acc ccc tac ggc gtc cgc gac ccc aag gcc gcc gtc gat 1680
Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp
545 550 555 560

caa ctg cgg acc gcc atc gcc aac acc aag cgc aaa tac ggc gcg atc 1728
Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile
565 570 575

gac cgg ccg ttc ggc gac gcc tcg cgc atg atc ctg aac gat gtg att 1776
Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile
580 585 590

gtt ccg ggc gcc gcc ggc tac ggc aac ctg ggt tcc ttc cgg gtc ttc 1824
Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe
595 600 605

acc tgg tcc gat cct gac gaa aac ggg gtt cgc acg ccc gtc cac ggc 1872
Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly
610 615 620

gag acg tgg gtg gcg atg atc gag ttc tcc acc ccg gtg cgg gcc tat 1920
Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr
625 630 635 640

ggc ctg atg agc tac ggc aat tct cgc cag ccg ggc acg acg cac tac 1968
Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr
645 650 655

agc gat cag atc gaa cgc gtg tcg cgg gcc gac ttc cgc gag ctg ttg 2016
Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu
660 665 670

ctg cgg cga gag cag gtc gag gcc gcc gtc cag gaa cgc acg ccc ttc 2064
Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe
675 680 685

aac ttc aag cca ggt acc acg aca aat cct ggt gta tcc gct tgg cag 2112
Asn Phe Lys Pro Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln

690 695 700

gtc aac aca gct tat act gcg gga caa ttg gtc aca tat aac ggc aag 2160
Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys
705 710 715 720

acg tat aaa tgt ttg cag ccc cac acc tcc ttg gca gga tgg gaa cca 2208
Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro
725 730 735

tcc aac gtt cct gcc ttg tgg cag ctt caa tag 2241
Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln
740 745

<210> 19
<211> 746
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 19
Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr
1 5 10 15

Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His
20 25 30

Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala
35 40 45

Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala
50 55 60

Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr
65 70 75 80

Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr
85 90 95

Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala
100 105 110

Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu
115 120 125

Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala
130 135 140

His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu
145 150 155 160

Gly Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp
165 170 175

Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln
180 185 190

Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala
195 200 205

His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly
210 215 220

Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn
225 230 235 240

Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln
245 250 255

Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg
260 265 270

Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys
275 280 285

Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala
290 295 300

Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly
305 310 315 320

Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp
325 330 335

Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val
340 345 350

Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg
355 360 365

Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly
370 375 380

Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys
385 390 395 400

Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser
420 425 430

Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys
435 440 445

Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met
450 455 460

Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro
465 470 475 480

Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala
485 490 495

Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser
500 505 510

Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln
515 520 525

Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys
530 535 540

Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp
545 550 555 560

Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile
565 570 575

Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile
580 585 590

Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe
595 600 605

Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly
610 615 620

Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr
625 630 635 640

Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr
645 650 655

```
Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu
            660                 665                 670

Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe
        675                 680                 685

Asn Phe Lys Pro Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln
    690                 695                 700

Val Asn Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys
705                 710                 715                 720

Thr Tyr Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro
                725                 730                 735

Ser Asn Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln
            740                 745
```

<210> 20
<211> 2247
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized CBD-fused GL-7ACA acylase sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2247)

<400> 20

```
atg ctg gcc gag ccg acc tcg acg ccg cag gcg ccg att gcg gcc tat      48
Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr
  1               5                  10                  15

aaa ccg aga agc aat gag atc ctg tgg gac ggc tac ggc gtc ccg cac      96
Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His
             20                  25                  30

atc tac ggg gtc gac gcg ccc tca gcc ttc tac ggc tac ggc tgg gcc     144
Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala
         35                  40                  45

cag gcg cgc agc cac ggc gac aat atc ctg cgc ctg tat gga gaa gcg     192
Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala
     50                  55                  60
```

cgg ggc aag ggg gcc gaa tac tgg ggc ccg gat tac gaa cag acg acc 240
Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr
65 70 75 80

gtc tgg ctg ctg acc aac ggc gtg ccg gag cgc gcc cag cag tgg tat 288
Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr
85 90 95

gcg cag cag tcg cct gat ttc cgc gcc aac ctc gac gcc ttc gcg gcg 336
Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala
100 105 110

ggc atc aac gcc tat gcg cag cag aac ccc gac gac atc tcg ccc gag 384
Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu
115 120 125

gtg cgg cag gtg ctg ccg gtc tcc ggc gcc gac gtg gtg gcc cac gcc 432
Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala
130 135 140

cat cgc ctg atg aac ttc ctc tat gtc gcg tcg ccc ggc cgc acc ctg 480
His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu
145 150 155 160

ggc ggt acc acg aca aat cct ggt gta tcc gct tgg cag gtc aac aca 528
Gly Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr
165 170 175

gct tat act gcg gga caa ttg gtc aca tat aac ggc aag acg tat aaa 576
Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys
180 185 190

tgt ttg cag ccc cac acc tcc ttg gca gga tgg gaa cca tcc aac gtt 624
Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val
195 200 205

cct gcc ttg tgg cag ctt caa ggt acc gag ggc gac ccg ccg gac ctg 672
Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln Gly Thr Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu
210 215 220

gcc gat cag gga tcc aac tcc tgg gct gtg gcg ccg ggc aag acg gcc 720
Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala
225 230 235 240

aat ggg aac gcc ctg ctg ctg cag aac ccg cac ctg tcc tgg acg acg 768
Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr
245 250 255

gac tac ttc acc tac tac gag gcg cat ctc gtc acg ccg gac ttc gaa 816
Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu
260 265 270

atc tat ggc gcg acc cag atc ggc ctg ccg gtc atc cgc ttc gcc ttc 864
Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe
275 280 285

aat cag cgg atg ggc atc acc aat acc gtc aac ggc atg gtg ggg gcc 912
Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala
290 295 300

acc aac tat cgg ctg acg ctt cag ggc gac ggc tat ctg tat gac ggt 960
Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly
305 310 315 320

cag gtg cgg ccg ttc gag cgg cgt cag gct tcg tat cgc ctg cgt cag 1008
Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln
325 330 335

gcg gac ggg tcg acg gtc gac aag ccg ttg gag atc cgt tcc agc gtc 1056
Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val
340 345 350

cat ggc ccg gtc ttc gag cgc gcg gac ggc acg gcc gtc gcc gtt cgg 1104
His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg
355 360 365

gtc gcc ggt ctg gat cgg ccg ggc atg ctc gag cag tat ttc gac atg 1152
Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met
370 375 380

atc acg gcg gac agc ttc gac gac tac gaa gcc gct atg gcg cgg atg 1200
Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met
385 390 395 400

cag gtg ccg acc ttc aac atc gtc tac gcc gac cgc gaa ggg acc atc 1248
Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile
405 410 415

aac tac agc ttc acg gcg tgg cgc cca aac ggg ccg agg gcg aca tcg 1296
Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser
420 425 430

cct tct ggc agg ggc tcg gcc ggg cga ttc ctc gcg tta ctg tgg act 1344
Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr
435 440 445

INSDOCID: <WO 0131038A1 I >

gag aca cac ccc tgg acg atc tgc cgc gcg tca cca atc cgc cgg gcc 1392
Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala
450 455 460

gct tcg tgc aga act cca atg atc cgc cgt gga cgc cga cct ggc ccg 1440
Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro
465 470 475 480

tca cct aca cgc cca ggg act tcc cct cct atc tgg cgc ccc aga cgc 1488
Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg
485 490 495

gca ctc cct gcg cgc tca gca aag cgt gcg tct gat gtc gag aac gac 1536
Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp
500 505 510

gac ctg acg ctg gaa cgc ttc atg gcg ctg cag ttg agc cac cgc gcc 1584
Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala
515 520 525

gtc atg gcc gac cgc acc ttg ccg gac ctg atc ccg gcc gcc ctg atc 1632
Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile
530 535 540

gac ccc gat ccc gag gtc cag gcg gcg gcg cgc ctg ctg gcg gcg tgg 1680
Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp
545 550 555 560

gat cgt gag ttc acc agc gac agc cgc gcc gcc ctg ctg ttc gag gaa 1728
Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu
565 570 575

tgg gcg cgt ctg ttc gcc ggc cag aat ttc gcc ggc cag gcg ggt ttc 1776
Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe
580 585 590

gcc acg ccc tgg tcg ctg gat aag ccg gtc agc acc ccc tac ggc gtc 1824
Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val
595 600 605

cgc gac ccc aag gcc gcc gtc gat caa ctg cgg acc gcc atc gcc aac 1872
Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn
610 615 620

acc aag cgc aaa tac ggc gcg atc gac cgg ccg ttc ggc gac gcc tcg 1920
Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser
625 630 635 640

cgc atg atc ctg aac gat gtg att gtt ccg ggc gcc gcc ggc tac ggc 1968
Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly
645 650 655

aac ctg ggt tcc ttc cgg gtc ttc acc tgg tcc gat cct gac gaa aac 2016
Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn
660 665 670

ggg gtt cgc acg ccc gtc cac ggc gag acg tgg gtg gcg atg atc gag 2064
Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu
675 680 685

ttc tcc acc ccg gtg cgg gcc tat ggc ctg atg agc tac ggc aat tct 2112
Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser
690 695 700

cgc cag ccg ggc acg acg cac tac agc gat cag atc gaa cgc gtg tcg 2160
Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser
705 710 715 720

cgg gcc gac ttc cgc gag ctg ttg ctg cgg cga gag cag gtc gag gcc 2208
Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala
725 730 735

gcc gtc cag gaa cgc acg ccc ttc aac ttc aag cca tag 2247
Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe Asn Phe Lys Pro
740 745

<210> 21
<211> 748
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 21
Met Leu Ala Glu Pro Thr Ser Thr Pro Gln Ala Pro Ile Ala Ala Tyr
1 5 10 15

Lys Pro Arg Ser Asn Glu Ile Leu Trp Asp Gly Tyr Gly Val Pro His
20 25 30

Ile Tyr Gly Val Asp Ala Pro Ser Ala Phe Tyr Gly Tyr Gly Trp Ala
35 40 45

Gln Ala Arg Ser His Gly Asp Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Glu Ala
50 55 60

Arg Gly Lys Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Pro Asp Tyr Glu Gln Thr Thr
65 70 75 80

Val Trp Leu Leu Thr Asn Gly Val Pro Glu Arg Ala Gln Gln Trp Tyr
85 90 95

Ala Gln Gln Ser Pro Asp Phe Arg Ala Asn Leu Asp Ala Phe Ala Ala
100 105 110

Gly Ile Asn Ala Tyr Ala Gln Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ser Pro Glu
115 120 125

Val Arg Gln Val Leu Pro Val Ser Gly Ala Asp Val Val Ala His Ala
130 135 140

His Arg Leu Met Asn Phe Leu Tyr Val Ala Ser Pro Gly Arg Thr Leu
145 150 155 160

Gly Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr
165 170 175

Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys
180 185 190

Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val
195 200 205

Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln Gly Thr Glu Gly Asp Pro Pro Asp Leu
210 215 220

Ala Asp Gln Gly Ser Asn Ser Trp Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala
225 230 235 240

Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro His Leu Ser Trp Thr Thr
245 250 255

Asp Tyr Phe Thr Tyr Tyr Glu Ala His Leu Val Thr Pro Asp Phe Glu
260 265 270

Ile Tyr Gly Ala Thr Gln Ile Gly Leu Pro Val Ile Arg Phe Ala Phe
275 280 285

Asn Gln Arg Met Gly Ile Thr Asn Thr Val Asn Gly Met Val Gly Ala
290 295 300

Thr Asn Tyr Arg Leu Thr Leu Gln Gly Asp Gly Tyr Leu Tyr Asp Gly
305 310 315 320

Gln Val Arg Pro Phe Glu Arg Arg Gln Ala Ser Tyr Arg Leu Arg Gln
325 330 335

Ala Asp Gly Ser Thr Val Asp Lys Pro Leu Glu Ile Arg Ser Ser Val
340 345 350

His Gly Pro Val Phe Glu Arg Ala Asp Gly Thr Ala Val Ala Val Arg
355 360 365

Val Ala Gly Leu Asp Arg Pro Gly Met Leu Glu Gln Tyr Phe Asp Met
370 375 380

Ile Thr Ala Asp Ser Phe Asp Asp Tyr Glu Ala Ala Met Ala Arg Met
385 390 395 400

Gln Val Pro Thr Phe Asn Ile Val Tyr Ala Asp Arg Glu Gly Thr Ile
405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Thr Ala Trp Arg Pro Asn Gly Pro Arg Ala Thr Ser
420 425 430

Pro Ser Gly Arg Gly Ser Ala Gly Arg Phe Leu Ala Leu Leu Trp Thr
435 440 445

Glu Thr His Pro Trp Thr Ile Cys Arg Ala Ser Pro Ile Arg Arg Ala
450 455 460

Ala Ser Cys Arg Thr Pro Met Ile Arg Arg Gly Arg Arg Pro Gly Pro
465 470 475 480

Ser Pro Thr Arg Pro Gly Thr Ser Pro Pro Ile Trp Arg Pro Arg Arg
485 490 495

Ala Leu Pro Ala Arg Ser Ala Lys Arg Ala Ser Asp Val Glu Asn Asp
500 505 510

Asp Leu Thr Leu Glu Arg Phe Met Ala Leu Gln Leu Ser His Arg Ala
515 520 525

Val Met Ala Asp Arg Thr Leu Pro Asp Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ile
530 535 540

Asp Pro Asp Pro Glu Val Gln Ala Ala Ala Arg Leu Leu Ala Ala Trp
545 550 555 560

Asp Arg Glu Phe Thr Ser Asp Ser Arg Ala Ala Leu Leu Phe Glu Glu
565 570 575

Trp Ala Arg Leu Phe Ala Gly Gln Asn Phe Ala Gly Gln Ala Gly Phe
580 585 590

Ala Thr Pro Trp Ser Leu Asp Lys Pro Val Ser Thr Pro Tyr Gly Val
595 600 605

Arg Asp Pro Lys Ala Ala Val Asp Gln Leu Arg Thr Ala Ile Ala Asn
610 615 620

Thr Lys Arg Lys Tyr Gly Ala Ile Asp Arg Pro Phe Gly Asp Ala Ser
625 630 635 640

Arg Met Ile Leu Asn Asp Val Ile Val Pro Gly Ala Ala Gly Tyr Gly
645 650 655

Asn Leu Gly Ser Phe Arg Val Phe Thr Trp Ser Asp Pro Asp Glu Asn
660 665 670

Gly Val Arg Thr Pro Val His Gly Glu Thr Trp Val Ala Met Ile Glu
675 680 685

Phe Ser Thr Pro Val Arg Ala Tyr Gly Leu Met Ser Tyr Gly Asn Ser
690 695 700

Arg Gln Pro Gly Thr Thr His Tyr Ser Asp Gln Ile Glu Arg Val Ser
705 710 715 720

Arg Ala Asp Phe Arg Glu Leu Leu Leu Arg Arg Glu Gln Val Glu Ala
725 730 735

Ala Val Gln Glu Arg Thr Pro Phe Asn Phe Lys Pro
740 745

<210> 22
<211> 52
<212> PRT
<213> Bacillus circulans

<210>
<220> CBD domain

<400> 22
Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn Thr Ala Tyr Thr
1 5 10 15

Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Lys Cys Leu Gln
20 25 30

Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn Val Pro Ala Leu
35 40 45

Trp Gln Leu Gln
50

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 23
aagccaggta ccacgacaaa tcc 23

<210> 24
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 24
aattcgggat ccctattgaa gctgcc 26

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 25
ccaatgcgga gcggccgctg accgggtacg 30

<210> 26

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 26
ccgcccaccg gtaccccgcc gctcgtgcac 30

<210> 27
<211> 3535
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized CBD-fused FR901379 acylase sequence

<220>
<221> CDS
<222> (953)..(3529)

<400> 27
gagctcaatt ccggatggtt ggagaggccg atccagacgg tgggcggggc gaagaggctg 60

tcggccaggc ccgcttcgac gaggtcgaag atcgaggcgg cgtccggacc gtccaggatg 120

gtgttctccg cgccgaccgc cagatagggc agcaggaaca cgtgcatctg ggccgagtgg 180

tagagcggca gggagtgcac gggccggtcg gtcgcggcga ggccgagcgc ggtgatcgcg 240

ctgacgtact cgtggaccag ggccccgtgc gtcatcatcg cgcccttggg cagggcggtg 300

gtcccggagg tgtacagcag ctgcaccagg tcgtcggagg cgggcgggcg ccgcggggtg 360

aacgcccgtt ccgtctccag ggcgtcgagc agcgagccgg gcgcgtcgcg gagcgcgcgc 420

accgggagtc cggcggggag ccgcccggcg aggtccgggt cggtcaggac gagggaggag 480

ccggactggt cgaggaggta ggccaggtcg tcgccggtga ggttctggtt gaccggtacg 540

tggacgagac cggcccgtgc gcaggcgagg aagccgatca gataggcgtc ggagttgtgc 600

gcgtaggcgg ccacccggtc gccgggggcg agagcgtact cctcggtgag gacggcggcg 660

```
gccgtggaga cggcggcgtc cagggagcgg taggtccagg tccggtcggc gtaccgcacg 720

gcggtccggt cgggggtgcg ccgggcgctg cgggtgagga cgccgtcgac tgtgctgctg 780

cgtacacctg tcatggcgtg atcctgtgcg tccgggccct cgggggtcaa gaggctggat 840

accgaccaga cggttgacag cttcccgggc tccctggctg agtgacgctt ggccgtccgg 900

gcgttccgga ccggccgcgc ccgtgccacc cgtaccgctg ggaggaaaca cc ttg acg 958
                                                          Leu Thr

tta cgc aac cgt ctg aga ctg ctc ggg gtc gcc ggt ctc gcc ctg ttc   1006
Leu Arg Asn Arg Leu Arg Leu Leu Gly Val Ala Gly Leu Ala Leu Phe
        -35                 -30                 -25

acc gtg tcg gcg tcg ctg ccg cct gcc acc gcg tcc ggg acc cag gag   1054
Thr Val Ser Ala Ser Leu Pro Pro Ala Thr Ala Ser Gly Thr Gln Glu
    -20                 -15                 -10

acg cgg cac ccg tcc ggg agc ggt ctt tcg gcc gtc atc cgg tac acg   1102
Thr Arg His Pro Ser Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg Tyr Thr
 -5                  -1   1               5                  10

gag tac ggc att ccg cac atc gtg gcg gag gac tac gcg cag ttg ggc   1150
Glu Tyr Gly Ile Pro His Ile Val Ala Glu Asp Tyr Ala Gln Leu Gly
             15                  20                  25

ttc ggc acc ggc tgg gcg cag gcc gcc gat cag gtg tgc acg ctg gcg   1198
Phe Gly Thr Gly Trp Ala Gln Ala Ala Asp Gln Val Cys Thr Leu Ala
         30                  35                  40

gac ggc ttc ctc acg gtg cgc ggg gag cgg tcg agg ttc ttc ggc ccg   1246
Asp Gly Phe Leu Thr Val Arg Gly Glu Arg Ser Arg Phe Phe Gly Pro
     45                  50                  55

gac gcc gcc acg gac tac tcc ctc tcc tcg gcg gcg acg aac ctc tcc   1294
Asp Ala Ala Thr Asp Tyr Ser Leu Ser Ser Ala Ala Thr Asn Leu Ser
 60                  65                  70                  75

agc gac ctg tac ttc cgg ggc gtc cgc gac agc ggc acg gtg gag aag   1342
Ser Asp Leu Tyr Phe Arg Gly Val Arg Asp Ser Gly Thr Val Glu Lys
                 80                  85                  90

ctg ctc aag gag ccc gcg ccc gcc ggt ccg agc agg gac gtc aag gag   1390
Leu Leu Lys Glu Pro Ala Pro Ala Gly Pro Ser Arg Asp Val Lys Glu
             95                 100                 105

acg atg cgc ggg ttc gcc gcc ggg tac aac gcg tgg atc gcg cag aac   1438
```

Thr Met Arg Gly Phe Ala Ala Gly Tyr Asn Ala Trp Ile Ala Gln Asn
110 115 120

cgg atc acc gac ccc gcc tgc cgg ggc gcg tcc tgg gtg cgc ccg gtg 1486
Arg Ile Thr Asp Pro Ala Cys Arg Gly Ala Ser Trp Val Arg Pro Val
125 130 135

acg gcg ctg gac gtg gcg gcg cgc ggc tac gcg ctg gcg gtg ctc ggc 1534
Thr Ala Leu Asp Val Ala Ala Arg Gly Tyr Ala Leu Ala Val Leu Gly
140 145 150 155

ggc cag ggg cgc ggc atc gac ggc atc acc gcg gca cag ccg ccg acc 1582
Gly Gln Gly Arg Gly Ile Asp Gly Ile Thr Ala Ala Gln Pro Pro Thr
160 165 170

gcc gct cct ccg gcg gcc ggg gtc acg ccc gag gag gcg gcg acg gcg 1630
Ala Ala Pro Pro Ala Ala Gly Val Thr Pro Glu Glu Ala Ala Thr Ala
175 180 185

gcg gag cgg ctg ctg tcg acg cag aac gcg gac atg ggt tcc aac gcg 1678
Ala Glu Arg Leu Leu Ser Thr Gln Asn Ala Asp Met Gly Ser Asn Ala
190 195 200

gtg gcc ttc gac ggc tcc acg acg gtg aac ggg cgc ggg ctg ttg ctc 1726
Val Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly Leu Leu Leu
205 210 215

ggc aac ccg cac tac ccg tgg cag ggc gga cgc cgc ttc tgg cag gcg 1774
Gly Asn Pro His Tyr Pro Trp Gln Gly Gly Arg Arg Phe Trp Gln Ala
220 225 230 235

cag cag acg atc ccc ggc gag ctg aac gtg tcg ggc gcg tcc ctg ctg 1822
Gln Gln Thr Ile Pro Gly Glu Leu Asn Val Ser Gly Ala Ser Leu Leu
240 245 250

ggc gcg acg acg atc tcg atc ggg cac aac gcc gat gtg gcg tgg agc 1870
Gly Ala Thr Thr Ile Ser Ile Gly His Asn Ala Asp Val Ala Trp Ser
255 260 265

cat acg gtc gcc acg ggc gtc acg ctg aat ctg cat cag ctc agc ctc 1918
His Thr Val Ala Thr Gly Val Thr Leu Asn Leu His Gln Leu Ser Leu
270 275 280

gat ccg gcc gac ccg acc gtc tat ctg gtg gac ggg aag cgg gag cgg 1966
Asp Pro Ala Asp Pro Thr Val Tyr Leu Val Asp Gly Lys Arg Glu Arg
285 290 295

atg acg cag cgg acg gtg agc gtc ccg gtg aag ggc ggg gcc gac gtg 2014

Met Thr Gln Arg Thr Val Ser Val Pro Val Lys Gly Gly Ala Asp Val
300 305 310 315

acc cgc acc cag tgg tgg acc cgc tac ggg ccg gtg gcc acc tcg atg 2062
Thr Arg Thr Gln Trp Trp Thr Arg Tyr Gly Pro Val Ala Thr Ser Met
320 325 330

ggc gcg ggg ctg ccg ttg ccg tgg acg gcg agc acg gcg tac gcg ctg 2110
Gly Ala Gly Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Leu
335 340 345

aac gat ccg aac gcg acg aat ctg cgg atg gcg gac acc ggt ctg ggc 2158
Asn Asp Pro Asn Ala Thr Asn Leu Arg Met Ala Asp Thr Gly Leu Gly
350 355 360

ttc ggc aag gcc cgc tcc acg ggt gac gtc gag cgt gcg ctg cac cgg 2206
Phe Gly Lys Ala Arg Ser Thr Gly Asp Val Glu Arg Ala Leu His Arg
365 370 375

tcg cag ggc atg ccg tgg gtg aac acg atc gcg gcg gac cgg gcg ggt 2254
Ser Gln Gly Met Pro Trp Val Asn Thr Ile Ala Ala Asp Arg Ala Gly
380 385 390 395

cgc tcg ttc ttc gcg cag tcg cag gtg ctg ccg agg atc acc gac gcg 2302
Arg Ser Phe Phe Ala Gln Ser Gln Val Leu Pro Arg Ile Thr Asp Ala
400 405 410

ttg gcg gag cgc tgc tcg acc ccg ctg ggc cgg gcc acc tac ccc gct 2350
Leu Ala Glu Arg Cys Ser Thr Pro Leu Gly Arg Ala Thr Tyr Pro Ala
415 420 425

tcc ggc ctc gcg gtg ctg gac ggt tcg cgg acg gac tgc gcg ctg ggc 2398
Ser Gly Leu Ala Val Leu Asp Gly Ser Arg Thr Asp Cys Ala Leu Gly
430 435 440

agc gac ccg gac gcg gtg cgg ccg ggg atc ttc ggc ccg ggc cgg atg 2446
Ser Asp Pro Asp Ala Val Arg Pro Gly Ile Phe Gly Pro Gly Arg Met
445 450 455

ccg gtg ctg aag aac cag ccg tac gtg gag aac tcc aac gac agc gcg 2494
Pro Val Leu Lys Asn Gln Pro Tyr Val Glu Asn Ser Asn Asp Ser Ala
460 465 470 475

tgg ctg acc aat gcg gag cgg ccg ctg acc ggg tac gag cgg gtc ttc 2542
Trp Leu Thr Asn Ala Glu Arg Pro Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Val Phe
480 485 490

ggc acg atc gcg acg ccc cgg tcg atg cgg acg cgc ggc gcg atc gag 2590

Gly Thr Ile Ala Thr Pro Arg Ser Met Arg Thr Arg Gly Ala Ile Glu
495 500 505

gac gtc gcg tcg atg gcg gac cgg ggc cgc ctc cgg gtc ggg gac ctt 2638
Asp Val Ala Ser Met Ala Asp Arg Gly Arg Leu Arg Val Gly Asp Leu
510 515 520

cag cgg cag cag ttc gcc aac cgt gcg ccg gcc ggg gat ctg gcc gcc 2686
Gln Arg Gln Gln Phe Ala Asn Arg Ala Pro Ala Gly Asp Leu Ala Ala
525 530 535

tcc gag gcc gcc aag tgg tgt gcg gcg ctg ccg ggc ggc acg gcc gtg 2734
Ser Glu Ala Ala Lys Trp Cys Ala Ala Leu Pro Gly Gly Thr Ala Val
540 545 550 555

ggc tcc gac gga acg ccg gtc gac gtg tcg gcg gcc tgc cgg gtg ctg 2782
Gly Ser Asp Gly Thr Pro Val Asp Val Ser Ala Ala Cys Arg Val Leu
560 565 570

cgg cgc tgg gac cgg acc gtg gac agc gac agc cgg ggc gcg ctg ctc 2830
Arg Arg Trp Asp Arg Thr Val Asp Ser Asp Ser Arg Gly Ala Leu Leu
575 580 585

ttc gac cgg ttc tgg cgg aag gcg tcg tcg gcg ccc gcc gcc gag ctg 2878
Phe Asp Arg Phe Trp Arg Lys Ala Ser Ser Ala Pro Ala Ala Glu Leu
590 595 600

tgg agg acg ccg ttc gat ccg gcc gac ccg gtg cgc act ccg cgc ggc 2926
Trp Arg Thr Pro Phe Asp Pro Ala Asp Pro Val Arg Thr Pro Arg Gly
605 610 615

ctg aac acg gcc gcg ccc gtc ctg ggc agg gcc ctg gcg gac gcc gtg 2974
Leu Asn Thr Ala Ala Pro Val Leu Gly Arg Ala Leu Ala Asp Ala Val
620 625 630 635

gcg gag ctg cgg gcg gcg ggc atc gcg ctg gac gcc ccg ctg ggc gag 3022
Ala Glu Leu Arg Ala Ala Gly Ile Ala Leu Asp Ala Pro Leu Gly Glu
640 645 650

cac cag ttc gtc gtg cgg aac ggc aag cgg ctc ccg atc ggc ggc ggg 3070
His Gln Phe Val Val Arg Asn Gly Lys Arg Leu Pro Ile Gly Gly Gly
655 660 665

acg gag tcg ctg ggc atc tgg aac aag acc gag ccg cag tgg aac gcg 3118
Thr Glu Ser Leu Gly Ile Trp Asn Lys Thr Glu Pro Gln Trp Asn Ala
670 675 680

gcg ggc ggc ggc tat acg gag gtg tcg tcg ggc tcc agc tac atc cag 3166

Ala Gly Gly Gly Tyr Thr Glu Val Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Ile Gln
685 690 695

gcg gtc ggc tgg gac gac agc cgc tgc ccg gtg gcc cgg acg ctg ctg 3214
Ala Val Gly Trp Asp Asp Ser Arg Cys Pro Val Ala Arg Thr Leu Leu
700 705 710 715

acg tac tcc cag tcg gag aac ccg aag tca ccg cac tac agc gac cag 3262
Thr Tyr Ser Gln Ser Glu Asn Pro Lys Ser Pro His Tyr Ser Asp Gln
720 725 730

acc agg ctg tac gcg ggt gag cgc tgg gtg acg tcc cgg ttc tgc gag 3310
Thr Arg Leu Tyr Ala Gly Glu Arg Trp Val Thr Ser Arg Phe Cys Glu
735 740 745

agg gac atc gcg cgt tcg ccg gac ctg cgg gtg gtg cgg gtg cac gag 3358
Arg Asp Ile Ala Arg Ser Pro Asp Leu Arg Val Val Arg Val His Glu
750 755 760

cgg cgg ggt acc acg aca aat cct ggt gta tcc gct tgg cag gtc aac 3406
Arg Arg Gly Thr Thr Thr Asn Pro Gly Val Ser Ala Trp Gln Val Asn
765 770 775

aca gct tat act gcg gga caa ttg gtc aca tat aac ggc aag acg tat 3454
Thr Ala Tyr Thr Ala Gly Gln Leu Val Thr Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr
780 785 790 795

aaa tgt ttg cag ccc cac acc tcc ttg gca gga tgg gaa cca tcc aac 3502
Lys Cys Leu Gln Pro His Thr Ser Leu Ala Gly Trp Glu Pro Ser Asn
800 805 810

gtt cct gcc ttg tgg cag ctt caa tag ggatcc 3535
Val Pro Ala Leu Trp Gln Leu Gln
815 820

<210> 28
<211> 858
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<400> 28
Leu Thr Leu Arg Asn Arg Leu Arg Leu Leu Gly Val Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Leu Phe Thr Val Ser Ala Ser Leu Pro Pro Ala Thr Ala Ser Gly Thr
20 25 30

Gln Glu Thr Arg His Pro Ser Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg
35 40 45

Tyr Thr Glu Tyr Gly Ile Pro His Ile Val Ala Glu Asp Tyr Ala Gln
50 55 60

Leu Gly Phe Gly Thr Gly Trp Ala Gln Ala Ala Asp Gln Val Cys Thr
65 70 75 80

Leu Ala Asp Gly Phe Leu Thr Val Arg Gly Glu Arg Ser Arg Phe Phe
85 90 95

Gly Pro Asp Ala Ala Thr Asp Tyr Ser Leu Ser Ser Ala Ala Thr Asn
100 105 110

Leu Ser Ser Asp Leu Tyr Phe Arg Gly Val Arg Asp Ser Gly Thr Val
115 120 125

Glu Lys Leu Leu Lys Glu Pro Ala Pro Ala Gly Pro Ser Arg Asp Val
130 135 140

Lys Glu Thr Met Arg Gly Phe Ala Ala Gly Tyr Asn Ala Trp Ile Ala
145 150 155 160

Gln Asn Arg Ile Thr Asp Pro Ala Cys Arg Gly Ala Ser Trp Val Arg
165 170 175

Pro Val Thr Ala Leu Asp Val Ala Ala Arg Gly Tyr Ala Leu Ala Val
180 185 190

Leu Gly Gly Gln Gly Arg Gly Ile Asp Gly Ile Thr Ala Ala Gln Pro
195 200 205

Pro Thr Ala Ala Pro Pro Ala Ala Gly Val Thr Pro Glu Glu Ala Ala
210 215 220

Thr Ala Ala Glu Arg Leu Leu Ser Thr Gln Asn Ala Asp Met Gly Ser
225 230 235 240

Asn Ala Val Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly Leu
245 250 255

Leu Leu Gly Asn Pro His Tyr Pro Trp Gln Gly Gly Arg Arg Phe Trp
260 265 270

Gln Ala Gln Gln Thr Ile Pro Gly Glu Leu Asn Val Ser Gly Ala Ser
275 280 285

Leu Leu Gly Ala Thr Thr Ile Ser Ile Gly His Asn Ala Asp Val Ala
290 295 300

Trp Ser His Thr Val Ala Thr Gly Val Thr Leu Asn Leu His Gln Leu
305 310 315 320

Ser Leu Asp Pro Ala Asp Pro Thr Val Tyr Leu Val Asp Gly Lys Arg
325 330 335

Glu Arg Met Thr Gln Arg Thr Val Ser Val Pro Val Lys Gly Gly Ala
340 345 350

Asp Val Thr Arg Thr Gln Trp Trp Thr Arg Tyr Gly Pro Val Ala Thr
355 360 365

Ser Met Gly Ala Gly Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ala Ser Thr Ala Tyr
370 375 380

Ala Leu Asn Asp Pro Asn Ala Thr Asn Leu Arg Met Ala Asp Thr Gly
385 390 395 400

Leu Gly Phe Gly Lys Ala Arg Ser Thr Gly Asp Val Glu Arg Ala Leu
405 410 415

His Arg Ser Gln Gly Met Pro Trp Val Asn Thr Ile Ala Ala Asp Arg
420 425 430

Ala Gly Arg Ser Phe Phe Ala Gln Ser Gln Val Leu Pro Arg Ile Thr
435 440 445

Asp Ala Leu Ala Glu Arg Cys Ser Thr Pro Leu Gly Arg Ala Thr Tyr
450 455 460

Pro Ala Ser Gly Leu Ala Val Leu Asp Gly Ser Arg Thr Asp Cys Ala
465 470 475 480

Leu Gly Ser Asp Pro Asp Ala Val Arg Pro Gly Ile Phe Gly Pro Gly
485 490 495

Arg Met Pro Val Leu Lys Asn Gln Pro Tyr Val Glu Asn Ser Asn Asp
500 505 510

Ser Ala Trp Leu Thr Asn Ala Glu Arg Pro Leu Thr Gly Tyr Glu Arg
515 520 525

Val Phe Gly Thr Ile Ala Thr Pro Arg Ser Met Arg Thr Arg Gly Ala
530 535 540

Ile Glu Asp Val Ala Ser Met Ala Asp Arg Gly Arg Leu Arg Val Gly
545 550 555 560

Asp Leu Gln Arg Gln Gln Phe Ala Asn Arg Ala Pro Ala Gly Asp Leu
565 570 575

Ala Ala Ser Glu Ala Ala Lys Trp Cys Ala Ala Leu Pro Gly Gly Thr
580 585 590

Ala Val Gly Ser Asp Gly Thr Pro Val Asp Val Ser Ala Ala Cys Arg
595 600 605

Val Leu Arg Arg Trp Asp Arg Thr Val Asp Ser Asp Ser Arg Gly Ala
610 615 620

Leu Leu Phe Asp Arg Phe Trp Arg Lys Ala Ser Ser Ala Pro Ala Ala
625 630 635 640

Glu Leu Trp Arg Thr Pro Phe Asp Pro Ala Asp Pro Val Arg Thr Pro
645 650 655

Arg Gly Leu Asn Thr Ala Ala Pro Val Leu Gly Arg Ala Leu Ala Asp
660 665 670

Ala Val Ala Glu Leu Arg Ala Ala Gly Ile Ala Leu Asp Ala Pro Leu
675 680 685

Gly Glu His Gln Phe Val Val Arg Asn Gly Lys Arg Leu Pro Ile Gly
690 695 700

Gly Gly Thr Glu Ser Leu Gly Ile Trp Asn Lys Thr Glu Pro Gln Trp
705 710 715 720

Asn Ala Ala Gly Gly Gly Tyr Thr Glu Val Ser Ser Gly Ser Ser Tyr
725 730 735

Ile Gln Ala Val Gly Trp Asp Asp Ser Arg Cys Pro Val Ala Arg Thr
740 745 750

Leu Leu Thr Tyr Ser Gln Ser Glu Asn Pro Lys Ser Pro His Tyr Ser
755 760 765

Asp Gln Thr Arg Leu Tyr Ala Gly Glu Arg Trp Val Thr Ser Arg Phe
770 775 780

Cys Glu Arg Asp Ile Ala Arg Ser Pro Asp Leu Arg Val Val Arg Val
785 790 795 800

His	Glu	Arg	Arg	Gly	Thr	Thr	Thr	Asn	Pro	Gly	Val	Ser	Ala	Trp	Gln
				805					810					815	
Val	Asn	Thr	Ala	Tyr	Thr	Ala	Gly	Gln	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Gly	Lys
			820					825					830		
Thr	Tyr	Lys	Cys	Leu	Gln	Pro	His	Thr	Ser	Leu	Ala	Gly	Trp	Glu	Pro
		835					840					845			
Ser	Asn	Val	Pro	Ala	Leu	Trp	Gln	Leu	Gln						
	850					855									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/07275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl[7] C12N 15/62, 1/21, 9/80, 11/12, C07K 17/12, 19/00, C12P 17/18, 21/02 //(C12N 9/80, C12R 1:19)(C12P 21/02, C12R 1:19)(C12N 9/80, C12R 1:465)(C12P 21/02, C12R 1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N 15/00-15/90, 9/78-9/86, C07K 14/00-14/825

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/L(DIALOG),BIOSIS(DIALOG),MEDLINE,GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO, 94/24158, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 27 October, 1994 (27.10.94) & AU, 9466347, A & EP, 695311, A1 & US, 5496934, A & JP, 8-509127, A & US, 5670623, A & US, 5719044, A & US, 5738984, A & US, 5837814, A	1-2,7,13-15 3-6,8-12,16-19
Y A	TAKESHI WATANABE et al., "The Roles of the C-Terminal Domain and Type III Domains of Chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in Chitin Degradation.", Journal of Bacteriology (01 August, 1994), Vol.176, No.15, pp.4465-4472	3-6,8-12,16-19 1-2,7,13-15
Y A	JP, 7-313161, A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 05 December, 1995 (05.12.95) (Family: none)	3-4,8-12,16,18 1-2,5-7,13-15,17,19
Y A	WO, 97/32975, A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 12 September, 1997 (12.09.97)	5-6,17,19 1-4,7-16,18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 January, 2001 (10.01.01)	23 January, 2001 (23.01.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& EP, 885957, A1 & CN, 1218507, A & KR, 99087515, A	
A	Peter Tomme et al., "Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains.", Journal of Chromatography B (11 September, 1998) Vol.715, No.1, pp.283-296	1-19
A	Shaorong Chong et al., "Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element.", Gene (19 June, 1997) Vol.192, No.2, pp.271-281	1-19

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP00／07275

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁷ C12N 15/62, 1/21, 9/80, 11/12, C07K 17/12, 19/00, C12P 17/18, 21/02
//(C12N 9/80, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 9/80, C12R 1:465) (C12P 21/02, C12R 1:465)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁷ C12N 15/00-15/90, 9/78-9/86, C07K 14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X Y	WO, 94/24158, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 27.10月.1994 (27.10.94) & AU, 9466347, A & EP, 695311, A1 & US, 5496934, A & JP, 8-509127, A & US, 5670623, A & US, 5719044, A & US, 5738984, A & US, 5837814, A	1-2, 7, 13-15 3-6, 8-12, 16-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
10.01.01	23.01.01

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ISA／JP）
郵便番号100－8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員） 本間 夏子　4N 2937
電話番号 03－3581－1101 内線 3488

C（続き）．関連すると認められる文献		
引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y A	TAKESHI WATANABE et al. "The Roles of the C-Terminal Domain and Type III Domains of Chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in Chitin Degradation.", Journal of Bacteriology (Aug. 1, 1994) Vol. 176, No. 15, p. 4465-4472	3-6, 8-12, 16-19 1-2, 7, 13-15
Y A	JP, 7-313161, A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 5. 12月. 1995 (05. 12. 95) (ファミリーなし)	3-4, 8-12, 16, 18 1-2, 5-7, 13-15, 17, 19
Y A	WO, 97/32975, A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 12. 9月. 1997 (12. 09. 97) & EP, 885957, A1 & CN, 1218507, A & KR, 99087515, A	5-6, 17, 19 1-4, 7-16, 18
A	Peter Tomme et al. "Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains.", Journal of Chromatography B (Sept. 11, 1998) Vol. 715, No. 1, p. 283-296	1-19
A	Shaorong Chong et al. "Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element.", Gene (Jun. 19, 1997) Vol. 192, No. 2, p. 271-281	1-19